

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Influencia de la alorreactividad KIR en el trasplante
allogénico de progenitorres hematopoyéticos haploidéntico,
no manipulado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Marina Bastos Oreiro

DIRECTORES

Ismael Buño Borde
José Luis Díez Martín

Madrid, 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas

Departamento de Medicina



**INFLUENCIA DE LA ALORREACTIVIDAD
KIR EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS
HAPLOIDÉNTICO, NO MANIPULADO**

Tesis Doctoral

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Medicina por:**

Mariana Bastos Oreiro

Directores:

**Ismael Buño Borde
José Luis Díez Martín**

Madrid 2017

AGRADECIMIENTOS

La gratitud es la memoria del corazón, por tanto, quiero empezar agradeciendo a todas y cada una de las personas que de una u otra forma me han ayudado a desarrollarme en mi vida y en mi profesión y han contribuido así a la realización de este trabajo:

A mi padre, por dejar en mí su huella y cuidarme siempre desde donde esté.

A mi madre, porque con su tenacidad, su inmensa fortaleza y su amor nos ha mantenido en el camino a pesar de las adversidades.

A mi hermana, por luchar siempre conmigo, por permanecer a mi lado a pesar de los obstáculos y la distancia, y por darme a mis sobrinos hermosos.

A mis abuelos, por sus enseñanzas de vida, y por criarme con tanto entusiasmo y entrega.

A Alberto, por cuidar de mi madre con tanto cariño.

A mi familia, de sangre y del corazón, en especial a mis suegros, por quererme y cuidarme como a una hija.

A mis maestros Octavio, Miguel, Ismael, Jorge y José Luís, por inculcarme la búsqueda del conocimiento, el buen hacer y la pasión por la profesión.

A Isma, por su generosa genialidad y su entrega infinita.

A Mónica, por guiarme y aceptarme sin prejuicios en mis primeros pasos en España.

A Javier, por haber creído en este proyecto y acompañarme con su enorme paciencia, experiencia y templanza en su realización.

A Antonio y Lucía, por enseñarme con entusiasmo y desinterés.

A mis compañeras Cristina y Ana, por acompañarme de la mejor manera en mis primeros pasos en el Marañón, ofreciéndome sus conocimientos, su confianza y su corazón.

A José María, por organizar mis datos e ideas con profesionalidad.

A Carmen y los técnicos del laboratorio de OPA, por su paciencia y su tiempo.

A todo el equipo del laboratorio de genética, por recibirme siempre con una sonrisa y enseñarme con alegría.

A Carolina y Julia, por acompañarme día a día con su amistad, su buen consejo, transmitirme la serenidad que a menudo pierdo, y amenizar así el trabajo diario.

A Elena, por su enorme apoyo al acompañarme en este camino de papeles y firmas, con compromiso y solidaridad.

A mis amigas Auxi, Ruth, Nuria y Nani por tantos buenos momentos que alegran mi vida.

A Mayra, por ayudarme a cuidar de mis niños, con tanto amor y compromiso.

A Sonia y Santi, por abrirnos las puertas de su corazón y hacernos sentir parte de su familia.

A Antonio, por tener para mí siempre disponible esa palabra cargada de experiencia, coherencia y honestidad.

A Patricia e Irene, compañeras de especialidad, que se han transformado en amigas enormes, y compañeras de vida en mis momentos más importantes.

A Chami, por su inmensa bondad, por su sosiego en la tempestad, por su sonrisa en el desconsuelo, por su amistad incondicional.

A mis hijos, Lu y Tomy, por ser la luz de mi vida.

A Manu, por ser mi amor, mi cómplice y todo... Gracias totales.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
INDICE	5
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	14
ABSTRACT.....	18
INTRODUCCIÓN	21
LA CÉLULA NK.....	22
EL TRASPLANTE ALOGÉNICO.....	27
EL TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO	29
LOS RECEPTORES KIR Y LA ALORREACTIVIDAD.....	32
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
DISEÑO DE LOS ENSAYOS.....	44
PACIENTES	44
REGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO Y PROFILAXIS	44
ESTUDIOS PARA VALORACIÓN DE LA ALORREACTIVIDAD	45
Estudio de ligandos KIR e incompatibilidad de ligandos.....	45
Estudio de genotipo KIR e incompatibilidad de genes inhibitorios (iKIR).....	46
Polimorfismo KIR2DL1	47
Estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo	48
Ensayo de citotoxicidad “in vitro” de las células NK.....	48
VARIABLES CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE INTERÉS	51
Definiciones y análisis estadístico	52
RESULTADOS.....	54
Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	55
“Mismatch” de ligandos KIR.....	56
Genotipo KIR.....	57
Polimorfismo del gen KIR2DL1.....	58
Estudio de inmunofenotipo por CMF (estudio prospectivo)	59
Ensayo de citotoxicidad	60
SUPERVIVENCIA.....	62
Análisis de la influencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1	67
Análisis de EICR en relación a la presencia de “mismatch”	68
Análisis de la citotoxicidad de las células NK (serie prospectiva)	69

DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍAS	82

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Pág.

FIGURA 1.	
Célula NK actuando inicialmente en respuesta a las señales de activación innata.....	24
FIGURA 2.	
Análisis por citometría de flujo de una población de células N.....	25
FIGURA 3.	
Fenotipo y funciones de las células NK.....	26
FIGURA 4.	
Receptores de superficie de la célula NK y sus ligandos.....	33
FIGURA 5.	
Modelos de alorreactividad KIR.....	35
FIGURA 6.	
Locus KIR con genes centroméricos y teloméricos, organización y “score”.....	36
FIGURA 7.	
Corrida electroforética, genotipo KIR.....	47
FIGURA 8.	
Descripción de la técnica para la realización del estudio de citotoxicidad	50
FIGURA 9.	
Ejemplo estudio expresión de receptores	60
FIGURA 10.	
Ejemplo de estudio de citotoxicidad por fluorimetría y degranulación	62
FIGURA 11.	
Gráficas de supervivencia de la serie global.....	63
FIGURA 12.	
Gráficas de supervivencia según la presencia de mismatch de ligandos KIR.....	64
FIGURA 13.	
Gráficas de supervivencia según la presencia de mismatch de genes KIR ihibitorios	65
FIGURA 14.	
Mortalidad tóxica, según el contenido telomérico de genes KIR activatorios en el donante.....	66
FIGURA 15.	
Gráficas de supervivencia según la presencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1 en el donante.....	68
FIGURA 16.	
Gráficas de incidencia de EICR aguda o crónica en relación a la presencia de mismatch de genes iKIR.....	69
FIGURA 17.	
Comparación de estudios de citotoxicidad, realizados mediante fluorimetría y degranulación mediante CMF	70

TABLAS

TABLA 1.	
Características de los pacientes incluidos en el análisis retrospectivo (todos los pacientes).....	56
TABLA 2	
Características de los pacientes incluidos en el análisis prospectivo.....	56
TABLA 3	
Diferencia de ligandos KIR entre donante y paciente.....	57
TABLA 4	

Haplotipos pacientes y donantes.....	57
TABLA 5	
Genes KIR inhibitorios. Diferencias entre pacientes y donantes.....	58
TABLA 6	
Distribución del polimorfismo del receptor KIR2DL1	58
TABLA 7	
Fenotipo KIR de las células NK del donante.....	59
TABLA 8	
Intensidad de citotoxicidad entre células donante del donante y células diana.....	61

ABREVIATURAS

AA: haplotipo KIR inhibitorio

ALO-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Bx: haplotipo KIR activatorio

EA: enfermedad activa

EICR: enfermedad injerto contra receptor

EICRa: enfermedad injerto contra receptor aguda

haplo-TPH: trasplante haploidéntico

HLA: “*human leucocyte antigen*”. Antígeno leucocitario humano

IAM: incidencia acumulada de muerte

IAR: incidencia acumulada de recaída

IcT: injerto contra tumor

iKIRs: KIR inhibitorios

INF: interferon

KIR: “*Killer immunoglobulin-like receptors*”. Receptores de tipo inmunoglobulina de la célula NK

LH: linfoma de Hodgkin

LLA: leucemia linfoide aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LNH: linfoma no Hodgkin

MAC-haplo: Acondicionamiento mieloablatoivo (del inglés “*myeloablative conditioning*”) en
HAPLO-TPH

MHC1: “*mayor histocompatibility complex type I*”. Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1

MT: mortalidad tóxica

NK: “*natural killer*”

Pt-Cy: Ciclofosfamida a dosis altas post-trasplante

RC: respuesta completa

RIC-haplo: Acondicionamiento intensidad reducida (del inglés “*reduced intensity conditioning*”) en HAPLO-TPH

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de evento

SMD: síndrome mielodisplásico

SMPc: síndrome mieloproliferativo crónico

TBI: “*total body irradiation*”. Irradiación corporal total

RESUMEN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos constituye la terapia de elección para muchos pacientes con neoplasias hematológicas, inicialmente con el objetivo de reconstituir la hematopoyesis dañada por la administración de terapias mieloablativas y posteriormente buscando el efecto antitumoral de las células infundidas. La introducción de nuevos tipos de trasplantes, ha incrementado el interés por el estudio de distintas poblaciones celulares en la búsqueda de optimizar el efecto del injerto contra el tumor (IcT). Estos estudios resultan de enorme relevancia para seleccionar al “mejor” donante, hecho que es especialmente importante en el contexto del trasplante haploidéntico (haplo-TPH), donde suele haber varios donantes disponibles.

La célula “*natural killer*” (NK) es un linfocito citotóxico que tiene un papel protagonista en el haplo-TPH. De hecho, en el haplo-TPH se utilizan estrategias para eliminar o inactivar a los linfocitos T del injerto, ya sea “*in vitro*” o “*in vivo*”, por lo que las células NK pasan a ser fundamentales en el mantenimiento de la alorreactividad. Estas células aprenden a activarse o inhibirse durante su maduración, mediante la unión o no de moléculas específicas, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (MHC1). Esta peculiar característica de los receptores KIR se ha utilizado para la selección de donantes más alorreactivos en el haplo-TPH “*T-depleted*” contribuyendo a disminuir las tasas de recaídas. Asimismo, los receptores KIR activatorios, y sus combinaciones centroméricas y el teloméricas en el donante, tienen implicación pronóstica en algunos tipos de trasplante en pacientes con leucemia aguda.

El objetivo del presente estudio fue demostrar si las parejas donante/receptor con más datos de alorreactividad NK valorad por estudio de ligandos, de genotipo y de citotoxicidad “*in vitro*”, tienen menor tasa de recaídas y mayor supervivencia que las menos alorreactivas, en el contexto del trasplante haploidéntico con ciclofosfamida post-trasplante (Pt-Cy). Para ello analizamos de forma retrospectiva en todos los pacientes sometidos a haplo-TPH con Pt-Cy en el Hospital G. U. Gregorio Marañón, desde el año 2007 al 2015, la presencia de “*mismatch*” de ligandos KIR, la presencia de

“*mismatch*” de genes KIR inhibitorios, el contenido de receptores KIR activatorios centroméricos y el teloméricos en el donante y la presencia de polimorfismos más activos de uno de los receptores KIR inhibitorios, el receptor KIR2DL1. Asimismo, estudiamos también la actividad de las células NK de forma prospectiva en aquellos pacientes trasplantados desde el 2013 al 2015, mediante estudio de citotoxicidad “*in vitro*” por fluorimetría, valorando también el grado de degranulación de las células NK mediante la identificación de una molécula lisosómica en la superficie celular (CD107a), por citometría de flujo.

Se incluyó un total de 65 pacientes para el análisis retrospectivo y 17 para el prospectivo.

Los resultados muestran que, en el contexto del haplo-TPH con Pt-Cy en neoplasias hematológicas, la presencia de al menos 1 “*mismatch*” entre genes KIR inhibitorios entre el paciente y el donante, se relaciona con una disminución de la tasa de recaídas (IAR 9% vs 58%, HR 10,3 [IC95%: 3,05-35] $p=0,0000$) y una mejoría de la supervivencia global (IAM 0% vs 40%, $p=0,0001$; SG: 78% vs 38%, $p=0,001$). Por otra parte, se ha observado que los pacientes que reciben injertos de donantes con contenido telomérico activatorio, presentan una disminución de la mortalidad no relacionada con la recaída o mortalidad tóxica (MT: HR 1,17e-07 [IC95%: 4,49e-8-3,05e-7], $p=0,000$). Sin embargo, no se encontraron beneficios en la supervivencia ni reducción de la tasa de recaídas, en los pares de paciente/donante con “*mismatch*” de ligandos KIR, con mayor contenido de receptores activatorios, con contenido activatorio en el centrómero, ni tampoco por la existencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1. Respecto al estudio prospectivo, se encontró una alta correlación entre las dos técnicas utilizadas para estudiar la actividad de las células NK, la degranulación por citometría de flujo midiendo CD107a y el estudio de fluorimetría. Los ensayos enfrentando células NK de los donantes contra blastos de eritroleucemia correspondientes a la línea celular K562, muestran una tendencia a una menor tasa de recaídas para los pacientes con donantes de citotoxicidad más intensa, aunque no se han podido confirmar estos resultados con blastos del paciente.

A partir de estos resultados podemos concluir que en el contexto del haplo-TPH con Pt-Cy, la presencia de al menos un “*mismatch*” de receptores iKIR entre el paciente y el donante disminuye las tasas de recaídas y mejora la supervivencia global, y que la presencia de contenido activatorio en el telómero de los donantes, mejora la MT, en pacientes con neoplasias hematológicas.

ABSTRACT

Allogeneic transplantation has historically been the gold standard for progenitor's reconstitution in patients with hematological malignancies, initially with the objective of administering myeloablative therapies and later looking for the graft vs tumour effect of the infused cells.

The development of new transplant modalities has increased the interest in these cell populations in the search to optimize the graft vs tumor effect, and it is an extremely important point to select the "best" donor. This is especially important in the haploidentical transplant setting, where several donors are often available.

The NK cell is a cytotoxic lymphocyte that plays a major role in the haplo-transplant setting, a procedure in which either "*in vitro*" or "*in vivo*" techniques are used to deplete or inactivate T lymphocytes of the graft, reason for which NK cells become essential.

Through the use of specific molecules, the KIR receptors (killer immunoglobulin-like receptors), these cells learn, during their maturation, activating or inhibiting themselves according to the presence or absence of binding to their ligand, major histocompatibility complex molecules type 1 (MCH1). This distinctive characteristic is used for donor selection in the setting of depleted haplo-transplant with the intention of decrease relapse rates. Likewise, activating KIR receptors and their different centromeric and telomeric combination in the donor genome have prognostic implications in some types of transplants in patients with acute leukemia.

Our aim in the present study was to demonstrate that donor/recipient pairs with greater NK alloreactivity data assessed by ligand and "*in vitro*" cytotoxicity studies have better survival and lower relapse rate than less alloreactive pairs, in the setting of non-T depleted haploident transplantation, with Pt-Cy.

To this end, we retrospectively analyzed the presence of KIR ligand mismatches, the presence of inhibitory KIR gene mismatches, the content of centromeric and telomeric activating KIR receptors in the donor genotype and the presence of a more active polymorphisms for one of the inhibitory

KIR receptors, the KIR2DL1, in all patients submitted to haplo-TPH with Pt-Cy at Gregorio Marañón Hospital from 2007 to 2015.

We also prospectively analyzed, in patients transplanted from 2013 to 2015, the activity of NK cells through two different methods: fluorimetric cytotoxicity and assessing the degree of cell degranulation by flow cytometry.

We included a total of 65 patients for the retrospective analysis and 17 for the prospective one.

We found that in the setting of haplo-trasplant with Pt-Cy in hematological malignancies, the presence of at least 1 mismatch between inhibitory KIR genes among patient and donor was related to a decrease in relapse rate (CIR 9% vs 58% (HR:10.3, [IC95%: 3.05-35] p=0.0000) and an improvement in overall survival (OS: 78% vs 38%, p=0.001; IAM 0% vs 40%, p=0.0001). On the other hand, we observed that patients receiving donor grafts with major activating telomeric content had a decrease in non-relapse-related mortality or toxic mortality (MT: HR 1.17e-07 [IC95%: 4,49e-8,05e-7], p = 0.000). However, we didn't find benefits for survival or decrease of the relapse rate in patient/donor pairs with KIR ligand mismatch, with more activating KIR receptors content, with activating content in the centromere, nor the presence of the polymorphism at KIR2DL1 receptor.

Regarding the prospective study, we found a high correlation between the two methods used: the degranulation by flow cytometry measuring the CD107a, and the fluorimetry study. Our assay facing donor NK cells with erythroleukemia blasts from K562 cell line shows a trend to lower rate of relapse for the patient/donor pairs with more intense cytotoxicity, although we were not able to confirm these data with blasts from the patient disease.

Under the light of these results, we can conclude that in the context of haplo-TPH with Pt-Cy, the presence of at least one mismatch of iKIR receptors between the patient and the donor decreases relapse rates and improves overall survival, and that the presence of activating content in the telomere of donors, improves MT in patients with haematological malignancies.

INTRODUCCIÓN

El trasplante alogénico HLA (“*human leucocyte antigen*”) idéntico o casi idéntico, ha sido durante décadas el método de reconstitución de progenitores en pacientes sometidos a terapias mieloablativas o radioterapia en pacientes con neoplasias hematológicas. Inicialmente, el propósito de esta intervención sólo iba dirigido a reemplazar el daño irreversible que la quimioterapia o la radioterapia a dosis máximas generaban sobre los progenitores medulares, sin embargo, con el tiempo se fueron descubriendo los efectos inmunológicos que las células del donante infundidas desarrollaban en el receptor, tanto los beneficiosos como los perjudiciales. Comenzó entonces a ser evidente, que determinadas células, como los linfocitos T del donante desempeñaban un rol fundamental en muchas de las complicaciones relacionadas con el procedimiento, así como también en la posibilidad de recaída de la enfermedad, al reconocerse la importancia de la presencia de diferencias mayores o menores en los antígenos de histocompatibilidad entre el donante y el receptor (1,2). Posteriormente será cuando se descubran mecanismos inmunológicos novedosos, que vendrán a otorgarle un papel protagonista a otros tipos celulares, como pueden ser las células “*natural killer*” (NK) implicadas en el efecto antitumoral del injerto. Estos contrastes inmunológicos van a ser especialmente interesantes en el trasplante haploidéntico donde, como veremos, estos mecanismos tomarán una relevancia especial. En los últimos años, esta modalidad de trasplante ha adquirido un papel fundamental, viniendo a revolucionar el campo del trasplante hematopoyético. Valorar el papel que las células NK desarrollan en el contexto de este procedimiento, y como pudieran alterar el pronóstico del paciente, ha sido el propósito de nuestra investigación.

LA CÉLULA NK

Las células NK fueron así llamadas por primera vez en el año 1975 (1,2) por Kiessling y Herberman (Instituto Karoliska en Suecia y NCI en Estados Unidos, respectivamente), quienes las bautizaron con el nombre de “*natural killer*” (asesinas naturales) por su capacidad “*in vitro*” de matar células tumorales. Las células NK son un tipo de linfocito que característicamente forman parte de la familia

de células linfoides innatas (CLI) y corresponden a una población predominantemente citotóxica, aunque también se conoce que puede adquirir funciones de memoria, características que las acercan también, de alguna, forma a la inmunidad adaptativa (1) (Figura 1). La familia de CLI se puede dividir en tres grandes grupos: el Grupo 1, que incluye a las células NK, se caracteriza por la expresión de “*T-box transcription factors Eomesodermin*” (EOMES) y “*T-bet*” (TBX21) y producen fundamentalmente IFN- γ en respuesta a células infectadas o transformadas; el Grupo 2 expresa GATA3, produce IL-13 e IL-15 para defendernos de infecciones principalmente por helmintos; y el Grupo 3 está caracterizado por la expresión del factor de transcripción nuclear ROR γ t (RORC) e incluye a los linfocitos fetales inductores de tejido (LTi) y LTi-like en el adulto. Cabe destacar que las células NK no constituyen el único representante del Grupo 1, y que algunas poblaciones minoritarias de NK pueden pertenecer a otros grupos (2).

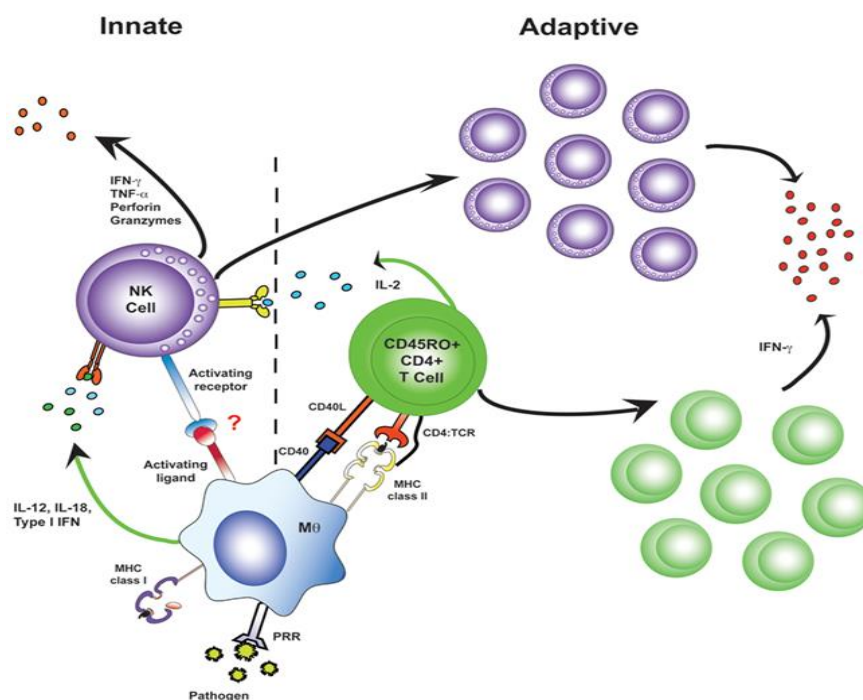


Figura 1. Célula NK actuando inicialmente en respuesta a las señales de activación innata (izquierda) y posteriormente como célula efectora en la respuesta adaptativa (Fuente de la ilustración: Horowitz et al (3).)

Las células NK tienen un efecto fundamental citotóxico contra células tumorales o patógenos intracelulares, y se consideran elementos cruciales para la resolución de infecciones, la vigilancia del sistema inmune contra el cáncer, así como también en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, e incluso en la evolución de la gestación. Como lo demuestran estudios con radioisótopos marcados, se generan en la médula ósea (4), y no precisan del timo para su maduración (5). Pueden liberar citocinas, entre las cuales se encuentran el interferón gamma ($\text{INF}\gamma$), el factor de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias, y distintas citocinas, tanto estimuladoras como inhibitorias dependiendo del tipo de estímulo que reciban (6). Se ha demostrado que los recién nacidos con deficiencia de células NK están en grave riesgo de desarrollar infecciones virales fulminantes, especialmente las relacionadas con los virus herpes y, asimismo, el 90% de los pacientes con linfocitopenia hemofagocítica hereditaria (enfermedad que cursa con actividad mínima o nula de las células NK y está caracterizada clínicamente por pancitopenia, hepatoesplenomegalia y fiebre) mueren dentro de los primeros 5 años de vida si no se les practica un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (7).

Las células NK constituyen un 15% de los linfocitos de sangre periférica y también se pueden encontrar en los diferentes tejidos, como el hígado, la cavidad peritoneal o la placenta.

Están caracterizadas fenotípicamente por la expresión del antígeno de superficie CD56, y la ausencia del CD3 (marcador de línea T), CD19 (marcador de línea linfocítica B) y CD14 (marcador de línea monocítica).

Un análisis más exhaustivo de estas células revela que existen dos poblaciones de las mismas, con diferente expresión de CD56, una expresión intensa ($\text{CD56}^{\text{bright}}$) y otra débil (CD56^{dim}), siendo aproximadamente 10% las primeras y 90% las segundas (8)(Figura 2).

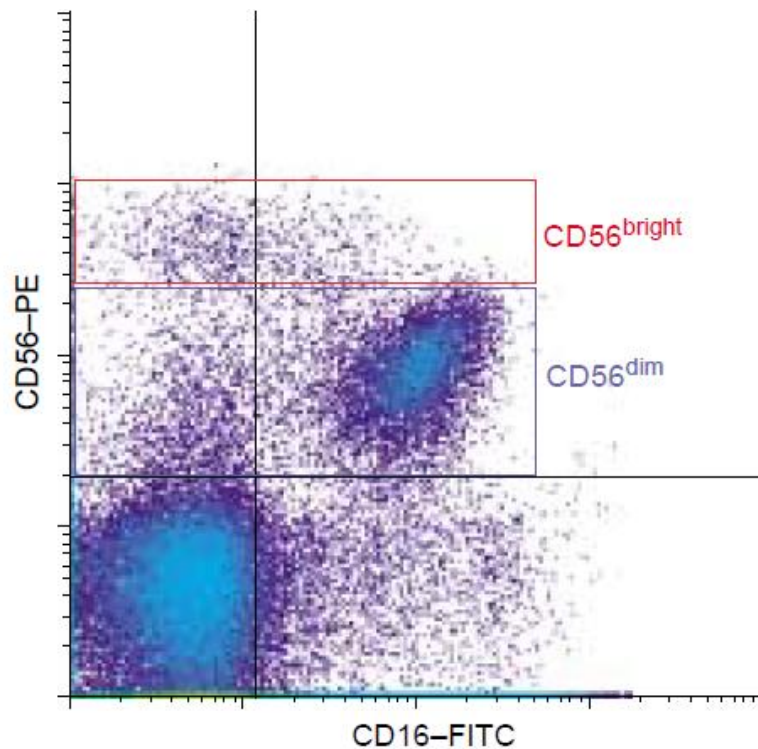


Figura 2. Análisis por citometría de flujo de una población de células NK, marcadas con anticuerpos anti CD16 (isotiocianato de fluoresceína (FITC), eje x) y anti CD56 (ficoeritrina (PE), eje y) evidenciando las poblaciones CD56^{bright} y CD56^{dim} NK. Las células NK CD56^{bright} (recuadro rojo) suponen un 10% de todas las células NK y son CD16⁻. El 90% de las células NK son CD56^{dim} (recuadro azul) y tienen intensa expresión del CD16. Fuente de la ilustración: Björkström, et al (7).

Durante la maduración de la célula NK, la densidad del CD56, y otros receptores que más adelante veremos, como el NKG2A y NCRs, disminuyen, mientras que la expresión de CD16, CD57 y los receptores KIR, entre otros, se incrementa (9)(Figura 3).

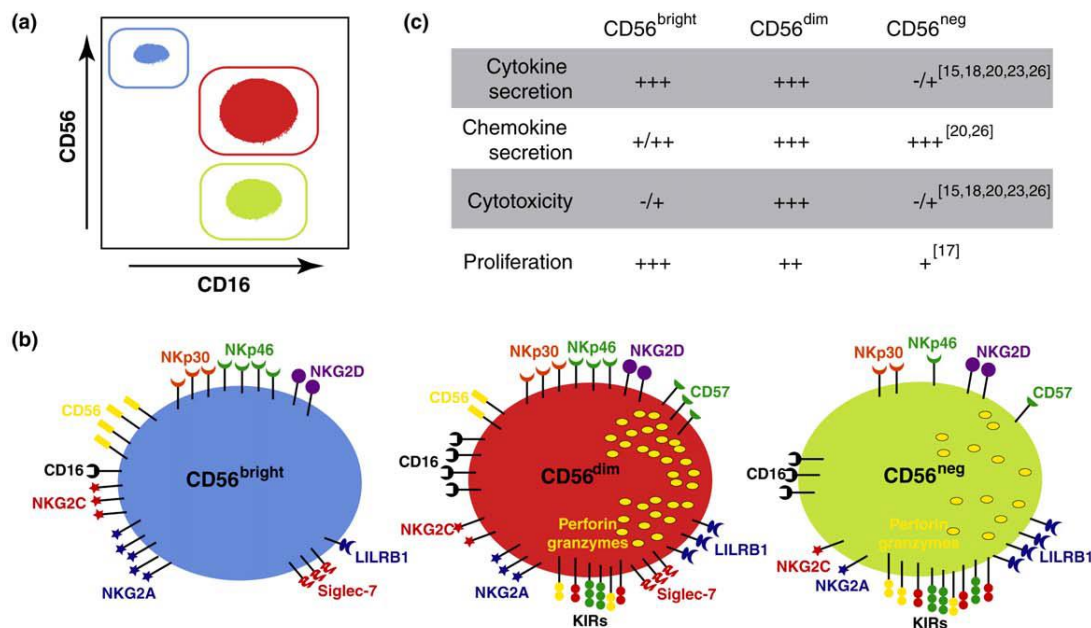


Figura 3. Fenotipo y funciones de las células NK CD56^{bright}, CD56^{dim}, y CD56⁻. (a) Ilustración esquemática de la expresión de CD56 y CD16 en linfocitos CD3⁺ CD4⁺ CD14⁻ CD19⁻. (b) Niveles de expresión de receptores de activación e inhibición en células NK CD56^{bright} (azul), CD56^{dim} (rojo), y CD56⁻ (verde). Fuente de la ilustración: Bjorkstrom, et al (8)

Las células NK CD56^{dim} son las responsables de la inmunidad temprana contra los agentes infecciosos a través de la secreción rápida de INF γ o la utilización de perforinas y granzimas para ejercer acciones citotóxicas (10) y, una vez disparado este mecanismo, desencadenan una rápida producción y secreción de lisosomas. Por otro lado, las células CD56^{bright}, se encargarán de la respuesta más tardía y mantenida, con liberación de grandes cantidades de INF γ . Existe asimismo un subgrupo de células NK llamadas CD56⁻, las cuáles parecen tomar prevalencia especial en los cuadros de infecciones virales (8).

Las células NK fueron inicialmente atractivas, desde el punto de vista clínico, al descubrirse su habilidad para matar otras células (como su nombre indica “células asesinas”) en estudios “*in vitro*”, pero fueron Kärre y colaboradores (11), quienes describieron por primera vez en el año 1986, las complejas señales intracelulares que dominan las acciones de estas células. Este trabajo describe

cómo una línea tumoral de ratón crece adecuadamente en un ratón singénico enfrentado a estas células, pero cuando se altera genéticamente su expresión de HLA-1, las células NK murinas ejercen su acción antitumoral. Es así como surgen las primeras hipótesis sobre la función que tendrían las moléculas HLA clase I en inhibir la acción citotóxica de estas células.

El mecanismo por el cual la célula NK reconoce a su objetivo, con su consecuente activación o inhibición para matar, es complejo, fascinante y está en continuo estudio. Es claro que la unión de sus receptores a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHCI), resulta crucial para que la NK pueda diferenciar células normales de las que no lo son, ya sea porque estén transformadas o infectadas. Estos particulares receptores, que más adelante veremos con detalle, tienen funciones activatorias e inhibitorias, y se agrupan en tres superfamilias: los receptores KIR (*“killer cell Ig like receptors”*) que se unen a los antígenos del MHC clase I HLA-A, B, y C; la superfamilia tipo C-lectina, que incluye a los receptores CD94 y NKG2, y la superfamilia de los receptores citotóxicos, cuyos ligandos en gran parte se desconocen (12).

EL TRASPLANTE ALOGÉNICO

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH), es sin duda el tratamiento de inmunoterapia adaptativa por excelencia, de hecho es el primer campo donde la terapia celular con células madre se puso en marcha (13). Diversas investigaciones avalan el concepto de que el efecto IcT debido al efecto inmunológico derivado de las células activas de donante, constituye el pilar fundamental del efecto terapéutico del al-TPH (14).

Cinco décadas atrás, el concepto de trasplante de médula para tratar pacientes con enfermedades hematológicas o déficit inmunológicos estaba cargado de mucho escepticismo, muy poco entusiasmo y muchas trabas teóricamente insoslayables (15). Si bien las primeras ideas en relación a la aplicación de extractos de médula ósea como medicina comenzaron a finales del siglo XIX, fueron las consecuencias de la segunda guerra mundial las que impulsaron la utilización de tejidos

trasplantados (ej: injertos de piel para víctimas quemadas), junto con el gran desarrollo de la transfusión de sangre.

El primer trasplante de médula ósea que se considera exitoso, fue realizado en el año 1969 en Nueva York, por el científico americano Dr Edward Donnall Thomas, en el “*Fred Hutchinson Cancer Research Center*” (16). Se realizó con un donante gemelo idéntico en una paciente con leucemia aguda mieloide. Años más tarde, el Dr Thomas sería reconocido con el premio Nobel de Medicina por ser pionero en sus investigaciones en el tratamiento de la leucemia aguda con alo-TPH (17). La evolución del HSCT mejoró notablemente en los 30 años subsiguientes con la optimización del tratamiento de soporte, el mejor control de las enfermedades hematológicas previo al trasplante, la profundización del conocimiento de los antígenos HLA y la mejoría del manejo de las complicaciones post trasplante. Sin embargo, estos más de 30 años de evolución han revelado problemas fundamentales como la insuficiente disponibilidad de donantes HLA-compatibles, que afecta a cerca de la mitad de pacientes que necesitan este procedimiento con urgencia. Sólo el 30% de los pacientes que necesitan un trasplante disponen de un hermano HLA idéntico. El registro de donantes voluntarios, que fue establecido en el año 1986, posee más de 16 millones de voluntarios sanos (18), pero se estima que sólo la mitad de los pacientes de etnia caucásica tendrán un donante disponible, incluso más dificultoso en poblaciones minoritarias, como en afroamericanos, donde la posibilidad de encontrar un donante compatible adecuado no supera el 20-40% (19). Ya que la disponibilidad de un donante HLA idéntico oscila entre el 25 y el 50%, es claro que un gran número de pacientes hoy en día requerirán de una fuente de progenitores alternativa. En la ausencia de un donante HLA idéntico familiar o no relacionado, existen otras fuentes alternativas de progenitores, como son la utilización de progenitores de sangre de cordón umbilical, o la utilización de un trasplante “mitad idéntico” o haploidéntico. Como veremos más adelante, es probablemente el trasplante haploidéntico la opción más prometedora para soslayar estas dificultades, considerando su accesibilidad y su coste.

Entre las diferentes neoplasias hematológicas que se someten a trasplante, una de las más importantes es la leucemia aguda (LA). Se trata de una enfermedad heterogénea, en la cual diferentes marcadores moleculares y anomalías citogenéticas (20) así como variables de la evolución clínica, nos permiten estratificar a los enfermos en diferentes grupos de riesgo (21). En las últimas décadas, el trasplante alogénico se ha convertido en el tratamiento de elección para una gran parte de los pacientes con LA de riesgo moderado y para todos los de riesgo alto (22) (23), y es la patología donde sin duda se utiliza más este procedimiento. Sin embargo, la supervivencia global de estas enfermedades es inferior al 50%, incluso en pacientes que han recibido trasplante de progenitores hematopoyéticos (24), fundamentalmente debido a la recaída de la enfermedad, que continúa siendo la causa más común de fallo de tratamiento (25,26). Otras neoplasias hematológicas, como los síndromes linfoproliferativos, mieloproliferativos, mielodisplásicos, en determinadas situaciones de recaída, refractariedad, o alto riesgo, también tienen al trasplante alogénico como única opción con intención curativa, con resultados en series amplias, cada vez más convincentes (27–31).

En el trasplante alogénico no manipulado, el efecto IcT esta principalmente mediado por los linfocitos T, los cuáles reconocen tanto a células tumorales (32) como a antígenos de tejidos sanos, y en consecuencia, acaba habitualmente asociándose al efecto inmune negativo generado por los linfocitos a nivel de estos tejidos, conocido como enfermedad injerto contra receptor (EICR), la cual es una de las complicaciones más temidas del trasplante (33).

En el trasplante alogénico se realiza tipaje HLA del receptor y el donante de los *loci* más relevantes clínicamente (A, B, C, DRβ1 y DQβ1). Durante años, sólo los donantes idénticos o con una única disparidad han sido utilizados para trasplantar pacientes, sin manipulación del injerto, con estrategias terapéuticas de profilaxis de EICR (13).

EL TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO

Se conoce como trasplante haploidéntico (haplo-TPH) al alo-TPH que se realiza con un donante que comparte con el paciente uno sólo de los haplotipos HLA (HLA-haploidéntico). El obstáculo fundamental para cruzar la barrera HLA en el trasplante recae sin duda sobre la respuesta intensa y bidireccional de las células T resultando en altas tasas de enfermedad injerto contra receptor (EICR) y de rechazo. Las aproximaciones iniciales para realizar haplo-TPH utilizaban regímenes de acondicionamiento letales y, como fuente de progenitores, médula ósea conteniendo linfocitos T (34), las cuales provocaban incidencias muy altas de fallo del injerto, EICR e infecciones, así como, en la mitad de los enfermos, complicaciones letales derivadas de un cuadro similar a un “síndrome del injerto”, caracterizado por edema pulmonar, fiebre, retención de líquidos y fallo renal (35). En estos estudios iniciales se demostró que la presencia de más de una diferencia HLA entre donantes familiares, afectaba notablemente a la supervivencia, pero que llamativamente estos pacientes presentaban menor riesgo de recaída (36). Luego de que se descubriera que la eliminación de células T del injerto en ratones prevenía la aparición de la tan temida EICR después de un trasplante alogénico, empezaron a expandirse las técnicas para lograr eliminación de células T “*ex vivo*”. Sin embargo, en la misma medida en que disminuían la tasa de EICR incrementaban la incidencia de fallo del injerto y de recaída (37). Para disminuir el riesgo de fallo del injerto en casos de eliminación de células T de injerto, algunos grupos emplearon regímenes de acondicionamiento intensivos, (como la ICT (irradiación corporal total), la tiotepa o la fludarabina) combinando así la selección positiva de células CD34+ por medio de la utilización de columnas magnéticas con una profunda eliminación de células T “*in vivo*” en el injerto. Con estas aproximaciones se consiguió el objetivo de disminuir el fallo de injerto, con tasas de EICR menores al 10%, pero, sin embargo, la mortalidad no relacionada con la recaída (mortalidad tóxica) se elevó por encima del 40%, principalmente debido a la gran tasa de infecciones (38). Llamativamente, se comenzó a observar que la pérdida de efecto “antileucemia” previamente mediada por linfocitos T, se mantenía a pesar de la eliminación de linfocitos T CD3+, gracias al efecto antileucémico de las células NK alorreactivas (39).

La utilización de ciclofosfamida a dosis altas post trasplante (Pt-Cy) es un método para conseguir vencer la barrera HLA en el trasplante alogénico, ya que es barato, efectivo y no especialmente complejo. Los primeros datos de la inmunotolerancia que genera la ciclofosfamida son del año 1959 cuando Schwartz y Dameshek (40) consiguieron demostrar la inhibición de la formación de anticuerpos en conejos mediante la administración de 6-mercaptopurina, la cual, de entre los diversos fármacos probados, fue el de mayor eficacia. En el contexto alogénico, fue en 1963 cuando se utilizó por primera vez la ciclofosfamida para evitar el rechazo en injertos cutáneos, observándose que la administración del fármaco en los 4 días posteriores al injerto prolongaba la vida del mismo (41,42). Posteriormente se pudo comprobar, que la ciclofosfamida resulta especialmente tóxica, no sólo en relación a la producción de anticuerpos, sino para las células en división estimuladas por antígenos (43). Estudios posteriores con infusión de células del donante en humanos demostraron que el uso de ciclofosfamida a las 48/72 horas de la infusión inhibe la proliferación de las células T estimulada por antígenos, generando tolerancia inmune (44). Los estudios clínicos con utilización de Pt-Cy en el contexto del haplo-TPH se iniciaron en el año 1999 en Seattle y Baltimore, utilizando inicialmente regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, conteniendo fludarabina y dosis bajas de ICT, y posteriormente aumentando la inmunosupresión sobre el paciente con incorporación de dosis más altas de fludarabina y agregando ciclofosfamida en el acondicionamiento, para evitar el fallo de injerto, con médula ósea como fuente de progenitores (45–47). Posteriormente, la utilización de esta estrategia se extendió a la utilización de acondicionamientos mieloablativos, el uso de sangre periférica como fuentes de progenitores e incluso en trasplantes de donante no emparentado (48). En la última década, diferentes protocolos de trasplante haploidentico, incluyendo modalidades con y sin eliminación de células T del injerto (anticuerpos anti-células T, ciclofosfamida a dosis altas post-infusión) han demostrado una evolución clínica prometedora (49), 50). Es de crucial importancia comprender la revolución que esto implica a la hora de tener disponibilidad de un donante (51). En

este sentido, hay que remarcar que el haplo-TPH está disponible para casi todos los pacientes, y no tiene costes de búsqueda y adquisición (52).

Como ha sido introducido previamente, a lo largo del último medio siglo las células NK han sido reconocidas, en estudios en animales, por su capacidad de eliminar células tumorales. Sin embargo, no ha sido hasta principios del 2000, cuando se ha reconocido su rol en humanos y su alta capacidad citotóxica, asociada a una reducción del riesgo de cáncer y, en particular, a la reducción del riesgo de leucemia, en el contexto del trasplante alogénico (53). De manera simultánea, se ha logrado profundizar en la descripción y el entendimiento de la familia de los genes de receptores llamados KIR (*“killer Immunoglobulin like receptors”*) (54)(55) elementos fundamentales de estas células para desempeñar su actividad citotóxica, y por medio de los cuales se puede deducir la “alorreactividad” entre paciente y donante al enfrentarse las células NK del donante con las células diana del paciente en el contexto del trasplante haploidéntico (56).

LOS RECEPTORES KIR Y LA ALORREACTIVIDAD

Los KIRs son un grupo de moléculas, entre los que existen tanto receptores activatorios como inhibitorios, que se expresan en la superficie de las células NK como también en algunos subtipos de linfocitos T. La longitud del dominio intracitoplasmático de estas moléculas, permite denominarlos como KIR-L (del inglés *“long”*) que serán los receptores inhibitorios o KIR-S (del inglés *“short”*) que serán los receptores activatorios (57). Algunos de los KIR inhibitorios (iKIRs) como por ejemplo los KIR2DL1/DL2/L3, KIR3DL1/3DL2, reconocen de forma específica moléculas del MCH clase I, que incluyen los antígenos leucocitarios humanos HLA-A, B, C y G (Figura 4) (58) (59).

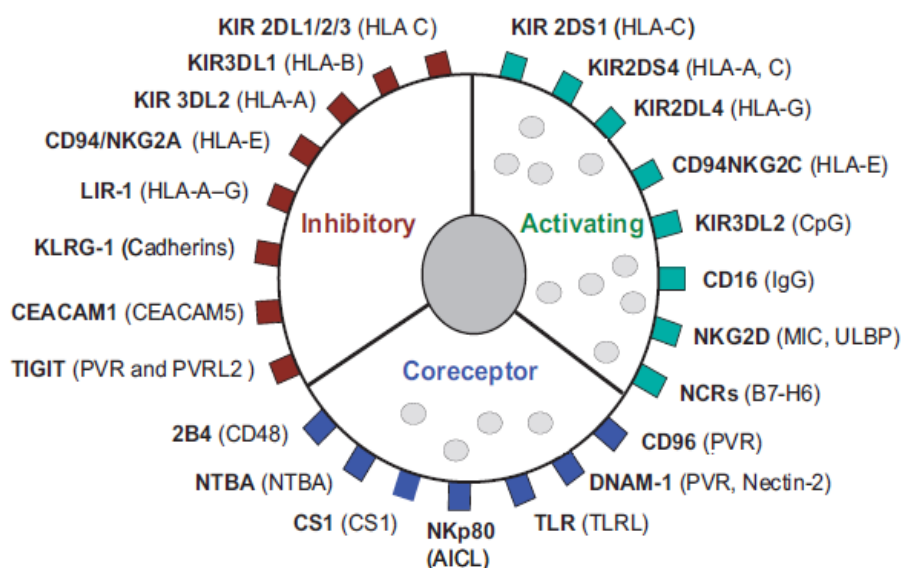


Figura 4. Receptores de superficie de la célula NK y sus ligandos. Los receptores están clasificados según su función primaria, sus ligandos respectivos aparecen entre paréntesis. Fuente de la ilustración: Leung W. et al (59).

El fallo en el reconocimiento adecuado entre el ligando y el receptor KIR desencadenará la acción citotóxica de la célula NK.

En el año 2002, el grupo investigador del Dr. Ruggeri de la Universidad de Perugia, en Italia, fue uno de los pioneros en demostrar el rol de la alorreactividad de las células NK para disminuir el riesgo de recaída de leucemia después del trasplante haploideéntico manipulado, con eliminación de linfocitos T del injerto (39), confirmado por el mismo grupo en una serie más extensa unos años más tarde (60). Se produce entonces una revolución en el campo del trasplante haploideéntico, cuando se empieza a afianzar el concepto de alorreactividad NK y se llega a comprender lo fundamental que puede ser ésta en el contexto del trasplante en general y para esta modalidad en particular, señalándose por primera vez que no sólo la inmunidad adaptativa, sino también la innata podrían ser fundamentales para la evolución clínica de estos pacientes (61,62). Sin embargo, mientras que algunos investigadores eran capaces de reproducir los resultados de Perugia (63) (64) (65) (66), otros grupos empezaron a comunicar datos contradictorios (67) (68) (69) (70) en relación a los beneficios

del “*mismatch*” de ligandos de receptores inhibitorios KIR. Estas diferencias probablemente se han generado debido a la gran disparidad entre los estudios realizados, ya sea porque en algunos de éstos se evalúan a la vez diferentes enfermedades, así como diferentes modalidades de trasplante, diferentes estrategias de profilaxis y distintas estrategias de eliminación de células T, e incluso se utilizan distintas definiciones de “alorreactividad KIR”. Focalizándonos en este último punto, es importante destacar que existen diferentes modelos predictivos que han sido postulados para valorar la alorreactividad de las células NK (Figura 5).

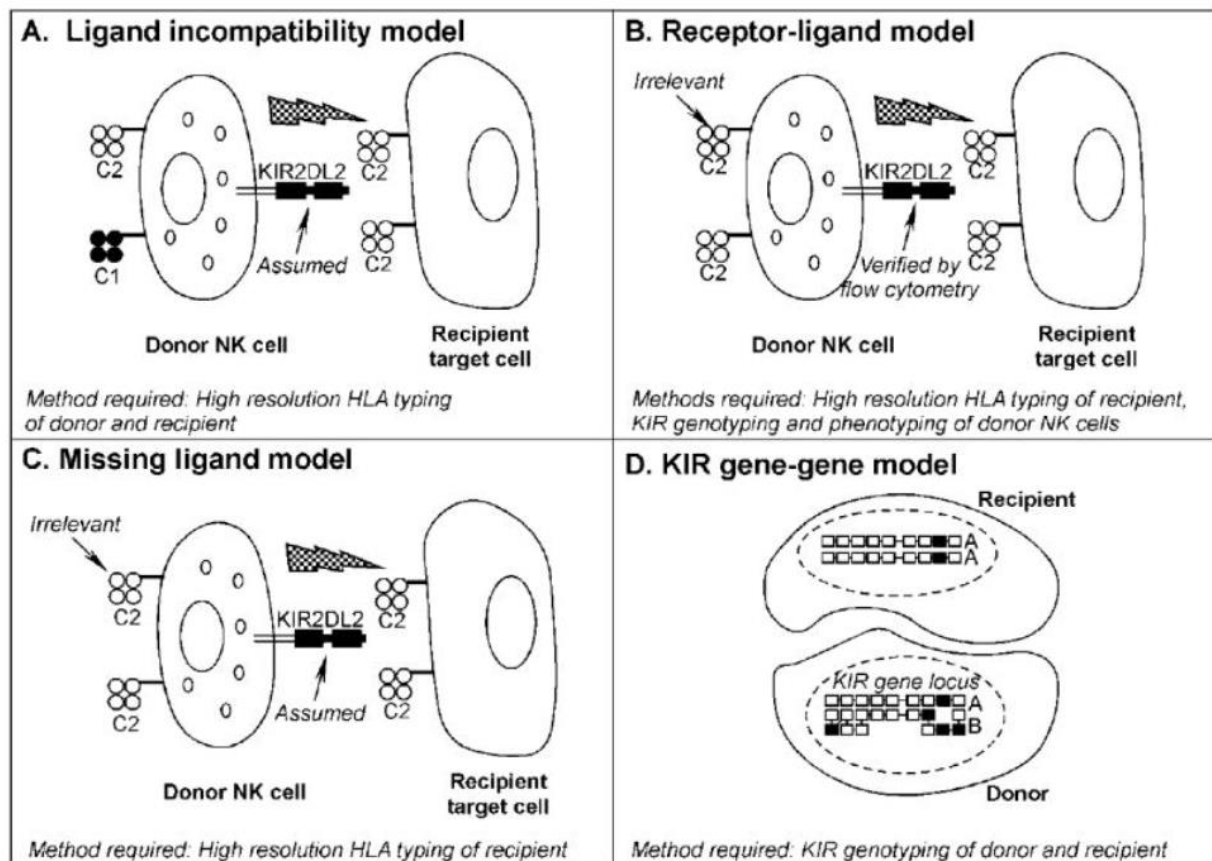


Figura 5. Modelos de alorreactividad KIR. A) Modelo de Incompatibilidad de ligandos B) Modelo receptor-ligando C) Modelo de ausencia de ligando D) Modelo genético. Fuente de la ilustración: Symons, et al. (71)

El modelo “KIR ligando” o incompatibilidad de ligandos (39), deriva de la hipótesis “*missing-self*”

(72) donde en un mismo individuo las moléculas del MCH clase I (ligandos KIR) se encuentran en interacción constante con los receptores de las células NK “educadas” de ese mismo individuo por medio de su unión a los iKIR, pero cuando las células NK reconocen elementos que carecen de estas moléculas los atacan considerándolos ajenos. De esta forma, se da por hecho que si un individuo expresa un ligando, expresa también el receptor para dicho ligando. El modelo “receptor-ligando” (73) (74), se basa en la observación de que no todos los genes de los receptores KIR están presentes en el genoma de todos los individuos y, además, pueden tener diferente expresión en la superficie de las células NK. Por este motivo, es preciso conocer el genotipo y el fenotipo KIR en cada caso, no deduciendo la presencia del receptor a través de la expresión o no del ligando, como en el modelo previo, sino buscándolo directamente. El modelo del “haplotipo KIR” o modelo genético (75) está basado en la idea de que a mayor número de receptores KIR activatorios, mayor será el potencial alorreactivo. El haplotipo KIR “A” contiene un sólo receptor KIR activatorio (KIR2DS4), mientras que el haplotipo KIR ‘B’ contiene más genes activatorios. Se ha postulado que los pacientes trasplantados con donantes con haplotipo B obtendrían mayor efecto alorreactivo de las células NK (76).

A		Centromeric part										RS	Telomeric part							Tel motif
Haplotype	Cen motif	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1			2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3/5	2DS1	2DS4	3DL2
A	Cen-A1																			Tel-A1
	Cen-B1																			Tel-B1
B	Cen-B2																			Tel-A1
	Cen-B1																			Tel-B1
	Cen-B2																			Tel-B1
	Cen-B1																			Tel-B1

B		N (%)	
Centromeric (2DS2, 2DL2, 2DL3)		AML	ALL
Cen-A/A	2DL3 only	532 (49)	155 (48)
Cen-A/B	2DL3 with 2DS2 and/or 2DL2	439 (40)	140 (43)
Cen-B/B	2DS2 and/or 2DL2; no 2DL3	115 (11)	28 (9)
Telomeric (3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4)			
Tel-A/A	3DL1 and 2DS4 only	659 (61)	185 (57)
Tel-A/B	3DL1 and 2DS4 with 3DS1 and/or 2DS1	382 (35)	119 (37)
Tel-B/B	lacking 3DL1 and/or 2DS4	45 (4)	19 (6)

C		N (%)	
Donor KIR Genotype	B content score	AML	ALL
A/A	0	374 (34)	99 (31)
B/x	1	374 (34)	121 (37)
	2	254 (23)	78 (24)
	3	84 (8)	25 (8)
	4		

Figura 6: El locus KIR se compone de genes centroméricos (Cen) y teloméricos (Tel). A) Organización de genes KIR en el locus. Las regiones centroméricas y teloméricas están separadas por una única secuencia llamada sitio de recombinación (RS). Se muestra el contenido de genes de los motivos comunes. Los genes estructurales conservados aparecen en gris, los genes del haplotipo B son azules y los genes del haplotipo A son rojos. B) Grupos usados para el análisis de Cen y Tel y su frecuencia en donantes. C) Puntuación (“Score”) utilizada, según contenido de genes KIR-B. Fuente de la ilustración: Cooley S, et al. (77)

Un último modelo, habitualmente referido como “*missing KIR ligand*”, o modelo de la “ausencia del ligando” (78), es un modelo pronóstico, no un modelo de selección de donante, y sería aplicable sólo cuando existe “*mismatch*” HLA. Está basado en la homocigotidad del receptor para los epítomos HLA-B o -C y resulta ser un factor predictivo para la recaída de la leucemia post-trasplante.

Por otra parte, y para hacer el análisis y la comprensión de estos receptores aún mas compleja, diversos investigadores han demostrado que las diferentes variantes polimórficas de los receptores KIR tienen diferente actividad. El receptor KIR2DL1, que está presente en el 95% de la población (79), presenta variantes polimórficas que parecen resultar estructuralmente más “fuertes” a la hora de activarse en respuesta a la ausencia de ligandos “C” (80). La presencia de una arginina en la posición 245 del dominio tras-membrana del receptor (KIR2DL1-R²⁴⁵) resulta más potente al activarse, en comparación con las variantes que poseen una cisteína en dicha posición (KIR2DL1-C²⁴⁵). De esta forma, el receptor KIR2DL1-R²⁴⁵ podría reclutar más dominios Src-homology-2 que contienen proteínas tirosina fosfatasa 2 y beta-arrestina 2, mostrando así una mayor inhibición de la polarización lipídica en la sinapsis inmune y, por lo tanto, menos regulación negativa de la expresión de moléculas de superficie en la interacción con el ligando. Según está descrito, la variante homocigota KIR2DL1-R²⁴⁵ está presente en el 60-70% de la población, la homocigota KIR2DL1-C²⁴⁵ en el 5-10% y la heterocigota (KIR2DL1-R²⁴⁵-KIR2DL1-C²⁴⁵) en el 25-30% de la población. Asimismo, el tener “*mismatch*” entre el paciente y el donante en ligandos “C”, y por tanto, tener alorreactividad según el modelos de ligandos, influenciaría la actividad de este receptor (81).

En resumen, el grado de alorreactividad KIR entre paciente y donante, se puede predecir conociendo

el repertorio de receptores KIR y de ligandos HLA del paciente y del donante. Sin embargo, cuál es el mejor modelo en cada modalidad de trasplante, es todavía un punto a terminar de dilucidar.

En el contexto del trasplante haploidéntico no manipulado, sin eliminación de células T del injerto, con Pt-Cy existe escasa información sobre la mejor forma de predecir alorreactividad. Symons y col (71) han encontrado una notable mejoría de la supervivencia en pacientes sometidos a esta modalidad de trasplante, cuando existe al menos un “*mismatch*” a nivel de genes de iKIR entre donante y receptor, en cualquier dirección. En nuestra experiencia, en análisis preliminares analizando los datos de los pacientes que han recibido trasplante haploidéntico no manipulado con Pt-Cy en nuestro centro, también hemos obtenido resultados similares (82).

Como se ha mencionado previamente, muchos estudios muestran un efecto protector previniendo la recaída en el contexto del trasplante haploidéntico con eliminación de linfocitos T, asociando en parte este beneficio a la alorreactividad NK (39,60,65,66) (83). Este beneficio ofrece la peculiar ventaja de inducir IcT sin que ocurra EICR, y reemplazaría por tanto el efecto IcT de los linfocitos T eliminados. Cabe destacar, que el efecto IcT mediado por NK, parece ser especialmente evidente en pacientes con leucemia en RC (38). Por otra parte, monitorizando de forma seriada la reconstitución inmune de las células NK posterior al trasplante, podemos observar que las células NK funcionantes maduras, derivadas de las células “*stem*”, aparecen en el receptor varias semanas tras el injerto, mientras que, en el período temprano post-trasplante, predominan las células NK pobremente funcionantes KIR-NKG2+ (84). Esto haría pensar que los pacientes que reciben un trasplante alogénico con células NK alorreactivas, no se beneficiarían de este efecto en los primeros días post-trasplante, y avalaría entonces, el uso de estrategias para la inmunoterapia con células NK activadas en este período, procedimientos que se encuentran actualmente en estudio con gran auge, con estudios en marcha que ya respaldan la posibilidad de su utilización, tanto con intención profiláctica para prevenir las recaídas, como terapéutica ante una recaída molecular inminente (85)(86)(87)(88) (89). Estos trabajos se han realizado principalmente en trasplante haploidéntico con eliminación de

células T del injerto, aunque nuevas investigaciones están actualmente en marcha para su aplicación en otras modalidades de trasplante (90).

Encontrar el donante más “alorreactivo” es de fundamental importancia, especialmente en esta modalidad de trasplante que ofrece un potencial mayor número de donantes (haploidénticos), de forma que es de extrema utilidad cualquier dato que contribuya a escoger al donante más adecuado.

HIPÓTESIS

El efecto IcT de las células NK del donante (alogénicas), mediado por la alorreactividad KIR, al interactuar con las células neoplásicas del enfermo, contribuye a la eliminación de los clones tumorales residuales que hayan escapado a la acción del acondicionamiento, permitiendo así reducir la tasa de recaída de la enfermedad y mejorar la supervivencia de los pacientes.

OBJETIVOS

El objetivo primario de este trabajo es estudiar la influencia de la alorreactividad NK, valorada por estudio de ligandos, genotipo y citotoxicidad “*in vitro*”, sobre la tasa de recaídas y la supervivencia, en pacientes sometidos a trasplante haploidéntico sin eliminación de linfocitos T del injerto, con Pt-Cy.

Para la consecución de este objetivo global, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el genotipo KIR de pacientes y donantes.
2. Estudiar el fenotipo de los receptores KIR de los donantes.
3. Estudiar la citotoxicidad, valorada “*in vitro*”, de las células NK del donante frente a líneas celulares tumorales o frente a las células tumorales del enfermo.
4. Correlacionar los hallazgos de los estudios de alorreactividad mencionados, con el método estándar utilizado en nuestro centro actualmente (sólo deducción mediante estudio HLA) para la selección de los donantes para el trasplante.
5. Correlacionar los resultados derivados de los objetivos anteriores con la evolución clínica de los pacientes sometidos a trasplante: incidencia acumulada de recaídas, EICR, supervivencia libre de enfermedad, mortalidad tóxica, supervivencia global.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE LOS ENSAYOS:

Los estudios de “*mismatch*” de ligandos, genotipo KIR y “*mismatch*” de genes KIR inhibitorios estudios analítico, longitudinales, retrospectivos, observacionales y unicéntricos. Por su parte, los estudios de citotoxicidad por fluorimetría “*in vitro*” y degranulación por citometría de flujo son analíticos, longitudinales, prospectivos, observacionales y unicéntricos.

PACIENTES

Todos los pacientes mayores de 18 años, con neoplasias hematológicas de alto riesgo que hayan sido sometidos a un trasplante haploidéntico no manipulado con Pt-Cy en nuestro centro, y sus respectivos donantes, fueron incluidos en el estudio de forma retrospectiva. Todos los pacientes/donantes sometidos a este mismo procedimiento a partir de marzo de 2013 y hasta diciembre de 2015, fueron incluidos de manera prospectiva. Los datos demográficos y las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se recogen en la Tabla 1.

REGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO Y PROFILAXIS

El régimen de acondicionamiento que se utilizó en nuestros pacientes para la realización del trasplante haploidéntico es una modificación del original descrito por Luznik y colaboradores en el año 2008 (47). Se sustituyó la utilización de ICT a dosis de 200cGy, por el uso de busulfán intravenoso (IV). Los pacientes recibieron, dependiendo de su edad, su patología de base y sus comorbilidades, dos diferentes intensidades de acondicionamiento: de intensidad reducida (RIC-haplo) y mieloablativo (MAC-haplo). El RIC-haplo consiste en la administración de fludarabina 30 mg/m²/día durante 5 días consecutivos, desde el día -6 al día -2, ciclofosfamida 14,5 mg/kg/día los días -6 y -5 y busulfán IV a dosis de 3,2 mg/kg/día 1 día el día -2, ó 2 días los días -3 y -2. El MAC-haplo consiste en la administración de fludarabina 30mg/m²/día durante 5 días consecutivos desde el

-6 al -2, ciclofosfamida 14,5 mg/kg/día los días -6 y -5 y busulfán IV durante 3 días desde el -4 al -2, y los de 4 días van con mayor dosis de fludarabina (40 mg/m²/día durante 5 días) y busulfán desde el día -6 al -3. La profilaxis para EICR utilizada se basa en altas dosis de ciclofosfamida (50 mg/kg/día) administrada los días +3 y +4, con hiper-hidratación y soporte con mesna, seguido por la administración de ciclosporina A y micofenolato mofetilo desde el día +5. El micofenolato mofetilo fue discontinuado en el día +35 en los pacientes que tuvieron ausencia de EICRa, mientras que la ciclosporina fue mantenida hasta el día +90, disminuyéndola progresivamente a partir de ese momento. En aquellos casos en que apareció enfermedad activa en el post-trasplante inmediato, en ausencia de datos de EICR, la inmunosupresión pudo discontinuarse más tempranamente, empezando en el día +45.

ESTUDIOS PARA VALORACIÓN DE LA ALORREACTIVIDAD

El estudio de la alorreactividad KIR en estos enfermos se hizo mediante el modelo clásico de incompatibilidad de ligandos KIR y también por el modelo genético. En estos pacientes se realizó también la determinación del polimorfismo del KIR2DL1 descrito previamente. Asimismo, en 17 pacientes pudimos realizar en forma prospectiva el fenotipo de las células NK del donante, así como el estudio funcional de citotoxicidad “*in vitro*”, y de degranulación por citometría de flujo, enfrentando las células efectoras del donante contra una línea celular leucémica.

Estudio de ligandos KIR e incompatibilidad de ligandos

El estudio de ligandos KIR se realizó mediante deducción de ligandos, a partir del tipaje HLA que normalmente realizamos a los pacientes candidatos a trasplante para valorar la compatibilidad con sus donantes (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Centrándonos en las moléculas HLA clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), se identificaron las moléculas HLA-C que presentaran una lisina en la posición 80 (Lys80, alelos C2) o un residuo de asparagina en la posición

80 (Asn80, alelos C1) y los alelos HLA-B con especificidad Bw4. Para cada par donante-receptor se designó incompatibilidad de ligando KIR, en sentido injerto contra tumor, cuando un alelo ya sea C1 o C2 está presente en el donante, pero no en el receptor.

Estudio de genotipo KIR e incompatibilidad de genes inhibitorios (iKIR)

A los pacientes y a los donantes se les realizó el estudio de los 15 genes y dos pseudogenes que componen el genotipo KIR. El estudio se realizó por PCR revelada por electroforesis en agarosa, mediante la utilización de un kit comercial para genotipado KIR (KIR Typing, Miltenyi Biotec), usando ADN genómico purificado (Maxwell 16 Blood DNA Kit, Promega), obtenido a partir de muestras de sangre periférica de los pacientes y sus donantes (Figura 7). Se valoró entonces, la presencia o ausencia de genes activatorios e inhibitorios. Una incompatibilidad o “*mismatch*” entre genes iKIR se definió como la presencia de un gen en el donante que está ausente en el receptor o viceversa. Por otra parte, una vez realizado el genotipado KIR, se determinó si los pacientes y los donantes tienen un haplotipo inhibitorio o activatorio, AA o Bx. Para los individuos Bx, se valoró el contenido telomérico y centromérico de los “*loci*” KIR y los cuales se puntuaron de 1 al 4, respecto a este contenido utilizando la escala previamente descrita (Figura 6) por Cooley y colaboradores (77).

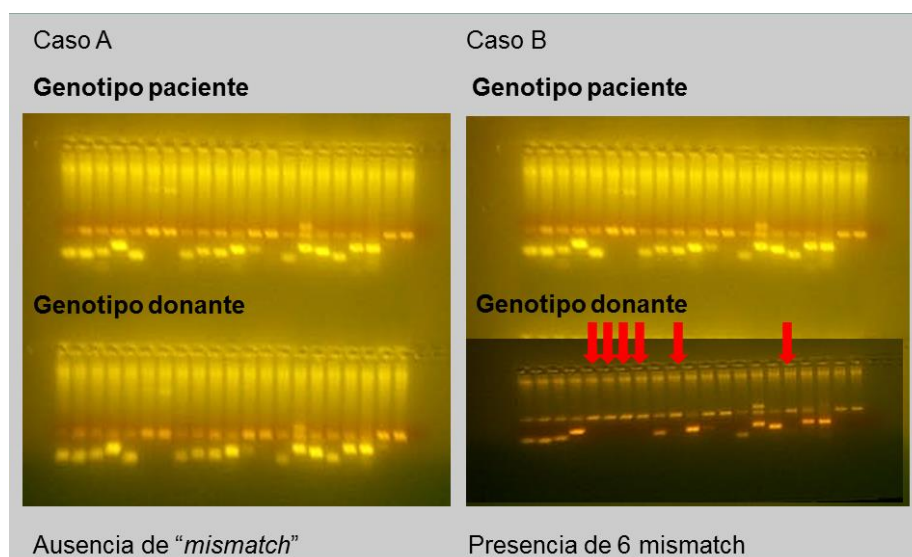


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa, para genotipo KIR. Ejemplo sin “mismatch” (izquierda) y con “mismatch” (derecha).

Polimorfismo KIR2DL1

Para el estudio del polimorfismo SNP (“single-nucleotide polymorphism”) del receptor KIR inhibitorio KIR2DL1, se utilizó una PCR fluorescente alelo específica, tal y como fue descrito previamente por Bari y colaboradores (81). Esta aproximación ha sido diseñada para identificar un único cambio de nucleótido en el ADN que genera una diferencia de un único aminoácido en la posición 245 de la proteína madura. Para ello, se utilizó una pareja de cebadores universales para amplificar todos los alelos KIR2DL1: cebador directo: 5'-CTCTTCATCCTCCTCTTCTTTC-3'; cebador reverso: 5'-GAAAGTCCTGCCTCTGTGGC-3'. Para identificar los alelos se utilizaron sondas específicas 6FAM-CATCGCTGGTGCTC-MGBNFQ y VIC-CATTGCTGGTGCTC-MGBNFQ. Cada mezcla, conteniendo un total de 25 µL, incluyó 250 nmol/L de sonda, 100 ng de ADN genómico, 5 pM de cebador directo y 5 pM de cebador reverso, 1 TaqMan “master-mix” para genotipo. Los diferentes pasos de la PCR fueron: 1) 2 minutos a 50°, 2) 10 minutos a 95°, 3) 15 segundos a 95° y 1 minuto a 60°. El paso 3 se repite hasta 45 ciclos. Dependiendo del resultado, los pacientes fueron designados como: homocigotos para KIR2DL1-R245, homocigotos para KIR2DL1-C245, o heterocigoto KIR2DL1-R245/KIR2DL1-C245.

Estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo

El estudio del fenotipo de las diferentes poblaciones de linfocitos B, T, NK y sus receptores, se realizó sobre muestras de sangre periférica total tras la lisis de la serie roja, analizadas mediante citómetro de flujo multiparamétrico de 5 colores (FC 500, Beckman Coulter®). Se empleó el software de adquisición CXP (Beckman Coulter®) y el software Infinicyt™ (Cytognos S.L.) para el análisis de los datos. Las células NK fueron definidas como aquellas CD3 negativas y CD56 positivas. Las células NK “*dim*” fueron definidas como aquellas con una expresión del CD56 moderada, y las “*bright*” como aquellas con una expresión del CD56 elevada. Las células T fueron definidas como aquellas positivas para el CD3, y negativas para el CD56. Se midió la expresión en la superficie de las células de los receptores KIR inhibitorios KIR2DL1, KIR2DL2, KIR3DL1, KIR2SD4, y del receptor NKG2D, así como el marcador de activación CD25.

Para los estudios de citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAbs) contra antígenos humanos conjugados con fluorocromos:

- BECTON DICKINSON (Franklin Lakes, NJ, USA): CD3 ficoeritrina (PE)-Cy7, isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD20-PE, CD45-FITC, CD158b1-FITC (KIR2DL2), NKG2D-aloficocianina (APC), CD158a, h-PE (KIR2DL1).
- BECKMAN COULTER (Fullerton, CA, USA): CD19-PE, CD56-APC
- MILTENYI BIOTEC Inc (Bergisch Gladbach, Alemania): CD158e-PE (KIR3DL1)
- BIOLEGEND (Biolegend Inc, San Diego, Ca, USA): CD158i-PE (KIR2DS4)

Ensayo de citotoxicidad “in vitro” de las células NK

La citotoxicidad de las células NK se estudió en un ensayo convencional de liberación de europium-TDA (Perkin-Elmer Wallac, Turku, Finland). La línea celular de eritroleucemia K562 fue utilizada como célula tumoral diana. En las situaciones en las que tuviéramos disponibles blastos del propio paciente, estas células también se utilizaron como diana. Las células diana fueron marcadas con el ligando fluorescente BATDA, ligando hidrofóbico que atraviesa fácilmente la membrana celular y, una vez dentro de la célula, se transforma en hidrofílico, quedando atrapado en el interior celular. Cuando existe citolisis, el ligando se libera y al interactuar con el europium forma un complejo estable y fluorescente, que puede ser medido fluorimetricamente (VictorTM, Wallac). Nuestras células efectoras fueron las NK de los donantes, para esto utilizamos células mononucleares de los donantes, tanto en situación de reposo, como estimuladas con 10 ng/mL interleucina-15 (IL-15) durante una noche. El número de células NK existente, en ese conjunto de elementos mononucleados, fue calculado multiplicando el recuento total de linfocitos por el porcentaje de células CD3-CD56⁺ valoradas mediante citometría de flujo. Los diferentes pasos del procedimiento se esquematizan de manera ilustrativa en la Figura 7. Las siguientes fórmulas se utilizaron para calcular la citotoxicidad espontánea y específica:

$$\% \text{ lisis específica} = [(\text{lisis del experimento}) - (\text{lisis espontánea})] / (\text{máxima lisis} - (\text{lisis espontánea})) \times 100$$

$$\% \text{ lisis espontánea} = [(\text{lisis espontánea}) - (\text{"background"})] / [(\text{máxima lisis}) - (\text{"background"})] \times 100$$

Los cultivos fueron realizados en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100 IU/mL y 2 mM/L de glutamina, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

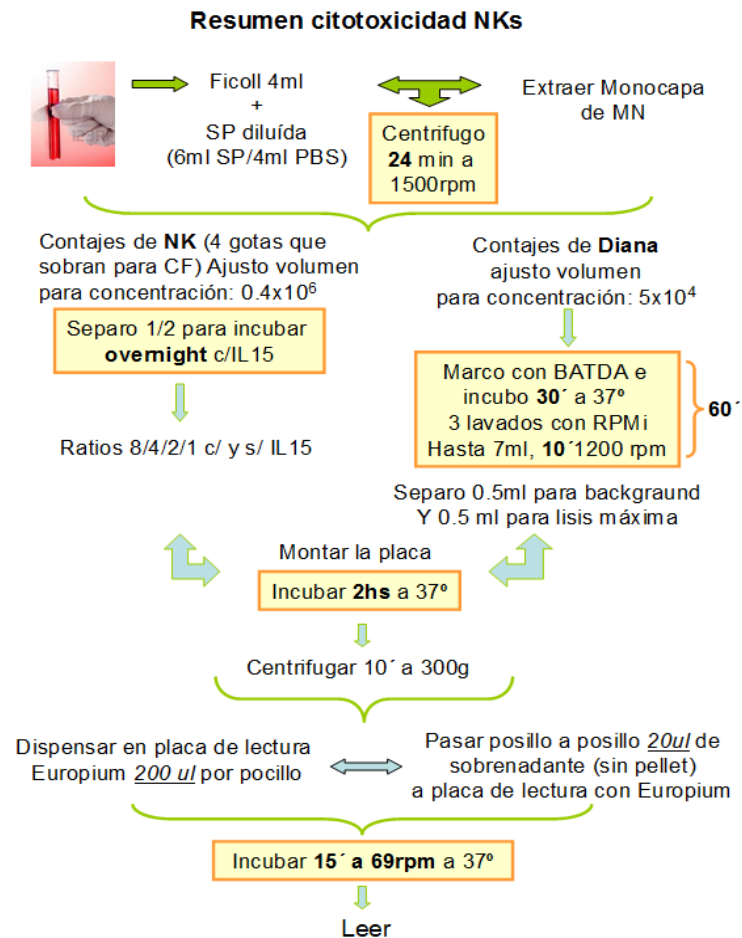


Figura 8. Descripción de la técnica para la realización del estudio de citotoxicidad

Para el análisis de la citotoxicidad se utilizó el anticuerpo monoclonal CD107a conjugado con PE (Miltenyi Biotec). El CD107a es una proteína lisosomal que se encuentra junto con la perforina en los gránulos citotóxicos de las células NK y de los linfocitos T (91). Al degranularse estas células, incrementan en su membrana la expresión de esta proteína, por lo que los ensayos que valoran la exocitosis de estos gránulos mediante la identificación de esta proteína, son útiles para identificar el grado de degranulación (92).

Una vez extraída la sangre periférica del donante, se obtuvo la capa mononuclear de la muestra mediante centrifugación en gradiente de densidad (ficoll), a partir de la que se determinó el porcentaje de células NK existentes (células efectoras). Posteriormente, se añadió IL-15 a la mitad de la muestra, quedando a 37 °C durante toda la noche, y permaneciendo la otra mitad en estado

derepos. Al día siguiente, se realizó una determinación basal del CD107a que expresaban las células efectoras. Posteriormente se enfrentaron las células efectoras en reposo y estimuladas con IL-15, a las células diana (K562, o blastos del paciente si estuvieran disponibles), en una atmósfera controlada (5% de CO₂) durante 2 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se determinó en ambas muestras de células efectoras, la expresión de CD107a y se estimó su variación respecto a la expresión basal.

VARIABLES CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE INTERÉS

Variables clínicas de los pacientes (cualitativas):

- Sexo; diagnóstico y estado de la enfermedad al trasplante; tipo de trasplante haploidéntico (ablatoivo, de intensidad reducida); fecha de trasplante; tipo y dosis de quimioterapia-esquema e intensidad del acondicionamiento; profilaxis de EICR realizada.

Variables relacionadas con la evolución clínica:

Cualitativas:

- Reacciones adversas relacionadas con la infusión de progenitores, desarrollo de complicaciones infecciosas y no infecciosas (sangrado, toxicidad), en el post-trasplante y gravedad de las mismas, desarrollo de EICR y grado clínico de la misma; afectación de órgano por EICR aguda y crónica y evolución de la misma, “*exitus*” y causa de “*exitus*” si lo hubiera.
- Grado de respuesta de la enfermedad hematológica: respuesta clínica, hematológica y mínima residual (quimerismo, enfermedad residual por métodos moleculares y por citometría de flujo).

Cuantitativas:

Número de linfocitos T y NK del paciente pre-trasplante, y en los días 0, 15, 30 100 y al año; prendimiento plaquetario (días en alcanzar plaquetas $>20.000/\text{mm}^3$ y $>50.000/\text{mm}^3$); prendimiento de neutrófilos (días en alcanzar neutrófilos $>500/\text{mm}^3$ y $>1000/\text{mm}^3$), día post-trasplante de aparición de síntomas de EICR aguda; día post-trasplante de aparición de síntomas de EICR crónica; día post-trasplante de “*exitus*” si lo hubiera; supervivencia global desde el día del trasplante; supervivencia libre de enfermedad desde el día del trasplante.

Variables relacionadas con las células NK y su alorreactividad

Previo a la realización del trasplante se determinó: genotipo KIR del paciente y del donante, deducción de ligandos KIR mediante estudio HLA del paciente y del donante, fenotipo NK mediante citometría de flujo del donante, valoración del grado de citotoxicidad “*in vitro*” de las células NK del donante enfrentadas a blastos del paciente o a línea celular K562 si no se dispusiera de los mismos.

Definiciones y análisis estadístico

La evolución de los pacientes fue actualizada en marzo de 2017. La supervivencia global (SG) fue definida como el tiempo desde el trasplante hasta la muerte del paciente, por cualquier causa. Los pacientes que sobrevivieron fueron censurados en el último seguimiento. La supervivencia libre de evento (SLE) fue definida como el tiempo desde el trasplante hasta la recaída, progresión de la enfermedad, retrasplante debido a fallo de injerto, o muerte por otra causa, cualquiera de éstas que ocurriese primero. La mortalidad toxica (MT), fue definida como la muerte por cualquier causa sin datos, previos a la misma, de recaída o progresión de la enfermedad. La incidencia acumulada de recaída (IAR) fue definida como la frecuencia con que los pacientes sufrieron recaídas dentro del período analizado, calculándose como el número de recaídas durante el período de análisis sobre el

número de individuos en riesgo al inicio del estudio, el evento competitivo considerado para el cálculo de la misma, fue muerte sin recaída.

Las variables cuantitativas fueron expresadas como mediana y rango, mientras que las cualitativas fueron expresadas como frecuencia y porcentaje.

La enfermedad injerto contra receptor, aguda (EICRa) y crónica (EICRc), fue evaluada según los criterios previamente establecidos (93,94).

El test exacto de Fisher se utilizó para la asociación entre variables de tipo cualitativo. La estimación de la SG, de la SLE, y al MNRR, se calculó con el método de Kaplan-Meier. Un resultado fue considerado estadísticamente significativo cuando valor de la p se encontraba por debajo de 0,05.

Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa “IBM SPSS Statistics” para Windows (versión 21.0. Armonk, NY: IBM Corp). Para la estimación de incidencia acumulada se utilizó el paquete estadístico Stata (versión 14. Windows, StataCorp, USA)

RESULTADOS

Los resultados del estudio se recogen en tablas para facilitar el entendimiento de los datos. A continuación se relacionan consecutivamente las tablas con las características de los pacientes, (separando los datos prospectivos y retrospectivos cuando corresponde), las características de los ligandos KIR, los haplotipos de pacientes y donantes, el número de mismatch de genes iKIR, la distribución de polimorfismos del receptor KIR2DL1, el fenotipo KIR de los pacientes, y el grado de citotoxicidad por fluorimetría y por citometría de flujo.

Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

En la siguiente tabla se recogen las características clínicas de los pacientes, incluyendo el sexo, la edad, la relación que existe entre el donante y el paciente, el diagnóstico de enfermedad hematológica que genera la indicación del trasplante, la intensidad del acondicionamiento quimioterápico recibido, la puntuación en los índices de riesgo, la situación de la enfermedad del paciente previo al trasplante, la presencia o no de “*mismatch*” de ligandos KIR entre el donante y el paciente, la presencia o no de “*mismatch*” de genes KIR inhibitorios entre el donante y el paciente, y el contenido de genes activatorios e inhibitorios en el donante , centroméricos y teloméricos.

Total de pacientes		65
Mediana de edad (rango)		41 (19-65)
Sexo n (%)	Masculino	49 (75)
	Femenino	16 (25)
Relación donante-paciente n (%)	Padre	10 (15)
	Madre	11 (17)
	Hermana/o	29 (44,5)
	Hija/o	15 (23,5)
Diagnóstico n (%)	LMA	22 (34)
	LLA	8 (12,5)
	SMD	5 (7)
	SMPc	3 (4,5)
	LH	19 (29,5)
	LNH	6 (9,5)
	MM	2 (3)
Intensidad acondicionamiento n (%)	Intensidad reducida	41 (63)
	Mieloablativo	24 (37)
DRI	<2	24 (37)

	≥2	41 (63)
Índice de Sorrow	<2	33 (51)
	≥2	32 (59)
Respuesta pre trasplante n (%)	RC	34 (52)
	EA	31 (48)
Mismatch de ligandos	SI	33 (51)
	NO	32 (49)
Haplotipos donantes n (%)	Bx	52 (80)
	AA	13 (20)
Mismatch de iKIR	SI	25 (38,5)
	NO	40 (61,5)
Genes KIR activatorios centroméricos en el donante n (%)	Cen AA	19 (30)
	CenBx	46 (70)
	Cen AB	35 (76)
	Cen BB	11 (24)
Genes KIR activatorios teloméricos en el donante n (%)	Tel AA	20 (31)
	TelBx	45 (69)
	Tel AB	30 (66)
	Tel BB	15 (33)

Tabla 1: Características de los pacientes incluidos en el análisis retrospectivo (todos los pacientes)

LMA: leucemia mieloide aguda, LLA: leucemia linfocítica aguda, SMD: síndrome mielodisplásico, SMPc: síndrome mieloproliferativo crónico, LH linfoma de Hodgkin, LNH Linfoma no Hodgkin, MM mieloma múltiple, RC respuesta completa, EA enfermedad activa

Total de pacientes		18
Mediana de edad (rango)		39 (20-52)
Sexo n (%)	Varón	11 (62)
	Mujer	7 (38)
Relación donante-paciente n (%)	Padre	3 (19)
	Madre	5 (31,5)
	Hermano	8 (44)
	Hijo	2 (6,5)
Diagnóstico n (%)	HL	7 (38)
	AML	5 (25)
	ALL	3 (19)
	NHL	3 (19)
Respuesta pre-trasplante n (%)	RC	10 (56)
	RP	8 (44)
Intensidad acondicionamiento n (%)	RIC	11 (62)
	MAC	7 (38)

Tabla 2: Características de los pacientes incluidos en el análisis prospectivo

“Mismatch” de ligandos KIR

En la siguiente tabla se recogen los datos de ligandos KIR en el paciente y en el donante, y la presencia o ausencia de mismatch. La asignación de los ligandos KIR depende de la composición de los antígenos de histocompatibilidad, por la presencia de aminoácidos lisina y arginina en la posición 80 de los antígenos C y B, y se ha deducido de los datos del estudio de histocompatibilidad realizado a los pacientes como práctica clínica habitual, con la asistencia de la herramienta EBML-EBI, IPD-KIR (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>)

Total	65	"Mismatch" alorreactivo
Paciente-Donante		
C1C1-C1C1	7 (11)	No
C1C1-C1C2	12 (18)	Si
C1C1-C2C2	2 (3)	Si
C2C2-C1C1	1 (1,5)	Si
C2C2-C1C2	10 (15)	Si
C2C2-C2C2	3 (4,5)	No
C1C2-C1C1	11 (17,5)	No
C1C2-C1C2	16 (25)	No
C1C2-C2C2	3 (4,5)	No

Tabla 3: Diferencia de ligandos KIR entre donante y paciente.

Genotipo KIR

En la siguiente tabla se muestran los resultados del estudio del haplotipo KIR, indicándose la distribución de los haplotipos activatorios e inhibitorios en el paciente y en el donante

Haplotipos pacientes, n (%)	
AA	16 (25)
Bx	49 (75)
Haplotipos donantes, n (%)	
AA	13 (20)

Bx	52 (80)
----	---------

Tabla 4: Genotipo KIR: haplotipos de pacientes y donantes
AA: inhibitorio, Bx activatorio

Diferencias entre paciente y donante en iKIR	65 (%)
Ausencia de diferencias	25 (38,5)
1 diferencia	24 (37)
2 diferencias	14 (21,5)
3 o más diferencias	2 (3)

Tabla 5: Genes KIR inhibitorios. Diferencias entre pacientes y donantes

Polimorfismo del gen KIR2DL1

En la siguiente tabla se recogen los resultados del estudio del polimorfismo del receptor KIR2DL1 en el donante, según la presencia de una arginina (receptor funcionalmente más “fuerte”) o una cisteína (receptor funcionalmente más “débil”) en la posición 245 de la proteína, y según el donante sea homocigoto o heterocigoto para ese alelo.

Estudio del polimorfismo de KIR2DL1	65 (%)
KIR2DL1-R ²⁴⁵ - KIR2DL1-R ²⁴⁵	46 (61) 21 con mm en C2*
KIR2DL1-R ²⁴⁵ - KIR2DL1-C ²⁴⁵	19 (29)
KIR2DL1-C ²⁴⁵ - KIR2DL1-C ²⁴⁵	0 (0)

Tabla 6: Distribución del polimorfismo del receptor KIR2DL1 entre los donantes. (mm: “*mismatch*”)

*en 21 casos los donantes con polimorfismo KIR2DL1-R²⁴⁵ homocigota presentaban “*mismatch*” para el ligando C2, y por lo tanto “alorreactividad” KIR por ligandos

Estudio de inmunofenotipo por CMF (estudio prospectivo)

En la siguiente tabla se recogen los porcentajes de los receptores KIR expresados por las células NK del donante. Dado que la diferencia entre los receptores inhibitorios y activatorios recae en el dominio intracelular, la valoración por CMF no permite diferencias entre los receptores activatorios e inhibitorios.

	Porcentaje de expresión receptores KIR en el donante (expresado sobre el total de células NK)					
Donante	KIR2DL1/D2S1	KIR2DL2/DS2	KIR3DL1/DS1	KIR2DS4	NKG2D	CD25
1	14%	18%	3%	78%	83%	16%
2	9%	12%	2%	48%	30%	0.5%
3	24%	8%	0%	-	-	-
4	14%	45%	3%	-	-	0.1%
5	10%	2%	16%	2%	81%	3%
6	0%	21%	8%	65%	0%	0%
7	16%	18%	8%	0%	0%	0%
8	3%	50%	0%	3%	6%	1%
9	18%	10%	6%	62%	95%	2%
10	20%	18%	6%	30%	90%	-
11	25%	20%	-	0%	97%	25%
12	11%	38%	0%	0%	50%	0%
13	0%	32%	13%	0%	95%	1%
14	30%	30%	0%	0%	0%	5%
15	13%	24%	12%	0%	15%	0%
16	31%	50%	16%	30%	80%	0%
17	27%	42%	21%	-	76%	15%

Tabla 7: Fenotipo KIR de las células NK del donante

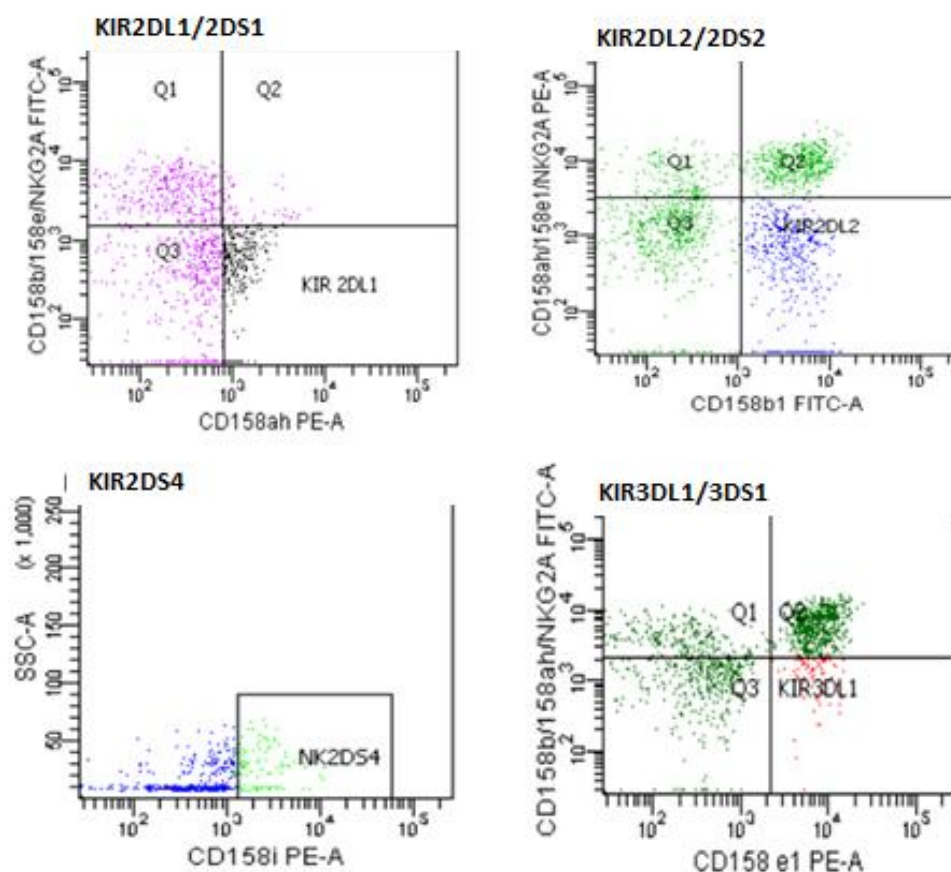


Figura 9. Ejemplo estudio expresión de receptores de un donante (donante 16).

Se contabiliza en el cuadrante inferior derecho para cada receptor, el porcentaje positivo para el CD indicado en el eje de las abscisas, y que es a su vez negativo para los CDs indicados en el eje de las ordenadas

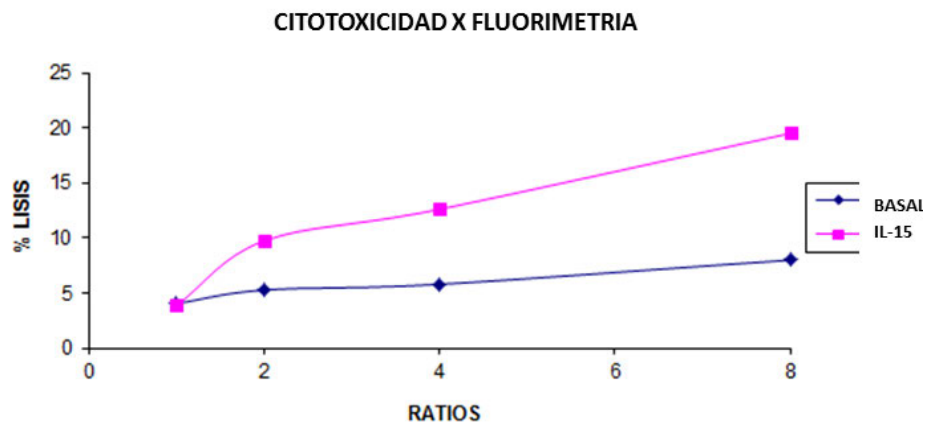
Ensayo de citotoxicidad

En la siguiente tabla se recogen los resultados del estudio de citotoxicidad in vitro de células efectoras del donante enfrentadas a línea celular K562, realizado por dos métodos: fluorimetría y degranulación midiendo en la superficie de la célula NK la expresión del CD107a, por citometría de flujo (solo pacientes con análisis prospectivo)

	NK/NK IL15	107a/107a c/IL15
Paciente	(citotoxicidad, fluorimetría% respecto a lisis máxima)	(degranulación CMF, % de elementos que expresan 107a)
1	bajo/bajo (6/12)	6/10

2	medio/alto	(15/55)	60/70
3	alto/alto	(60/70)	30/70
4	medio/medio	(40/40)	20/30
5	alto/alto	(90/100)	30/50
6	alto/alto	(70/70)	50/70
7	medio/medio	(30/50)	20/40
8	bajo/medio	(5/15)	1/5
9	medio/medio	(30/35)	15/25
10	bajo/bajo	(10/15)	3/5
11	medio/medio	(30/40)	7/20
12	medio/alto	(30/70)	20/30
13	bajo/bajo	(2/6)	1/3
14	bajo/bajo	(6/15)	10/15
15	bajo/medio	(5/25)	6/15
16	bajo/bajo	(7/20)	10/13
17	medio/medio	(30/30)	17/40

Tabla 8: Intensidad de citotoxicidad entre células donante del donante y células diana.
La información es la referida al ratio 8/1



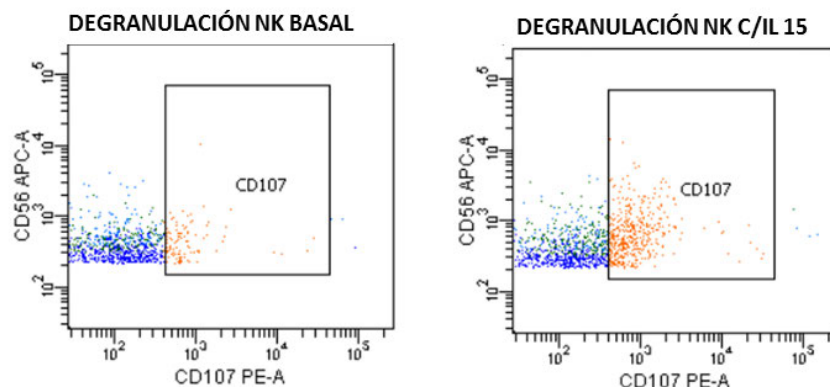


Figura 10. Ejemplo de estudio de citotoxicidad por fluorimetría y degranulación por citometría de flujo en un paciente
Corresponde al mismo paciente/donante referido en el estudio de receptores KIR por citometría de flujo,

SUPERVIVENCIA

Serie global de pacientes

La supervivencia global (SG) de la serie fue del 65%. La incidencia acumulada de muerte por la enfermedad (IAM), siendo el evento competidor la muerte por otra causa, fue del 17% (IC95% 9-27). La incidencia acumulada de recaída (IAR) de la serie fue del 29% (IC95% 18-40). La incidencia acumulada de mortalidad no relacionada con la recaída, o mortalidad tóxica (IAMT) fue del 18% (IC95% 10-29). Todos estos datos están expresados a dos años. La mediana de seguimiento de la serie fue de 33 meses (r: 13-57).

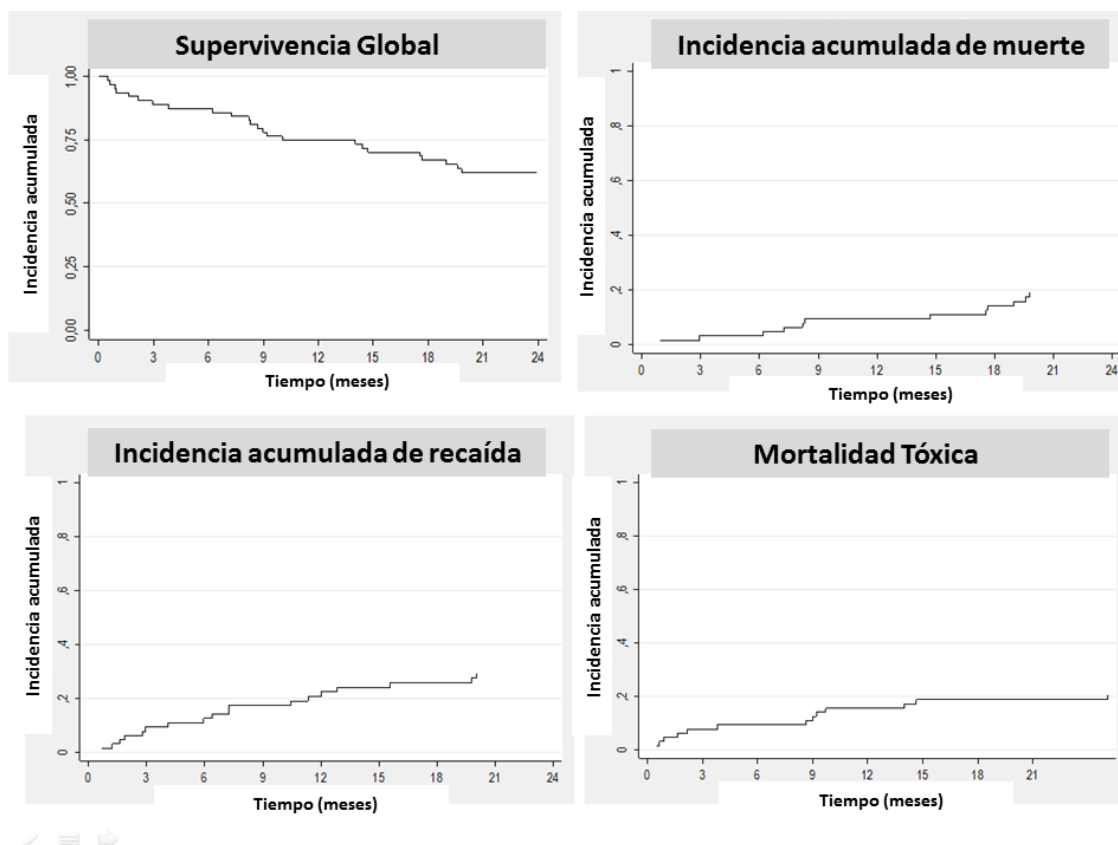


Figura 11. Supervivencia global, incidencia acumulada de muerte, incidencia acumulada de recidiva y mortalidad tóxica de la serie global de pacientes.

Influencia del “*mismatch*” en ligandos KIR sobre la supervivencia

Entre los pacientes que presentaron “*mismatch*” de ligandos KIR con sus donantes, la SG fue de 65% en comparación con los que no lo presentaron que fue de 58% ($p=0,11$), la IAM fue de 19% en comparación con los que no tenían “*mismatch*”, donde fue de 20% ($p=0,9$), con una HR para la ausencia de “*mismatch*” de 0.9 (IC95%: 0,3-2,6). La IAR fue de 20% en ambos grupos ($p=0,7$), con una HR para la ausencia de “*mismatch*” de 1,1 (IC95%:0,44-2,7). La IAMT fue de 19% para los pares con *mismatch*, en comparación con los que no tenían “*mismatch*” donde fue del 20% ($p=0,6$), HR: 1.2 (IC95%: 0,4-3,6). Podemos concluir en este apartado que, en nuestra serie, no existen diferencias para la supervivencia por la presencia o ausencia de “*mismatch*” de ligandos KIR.

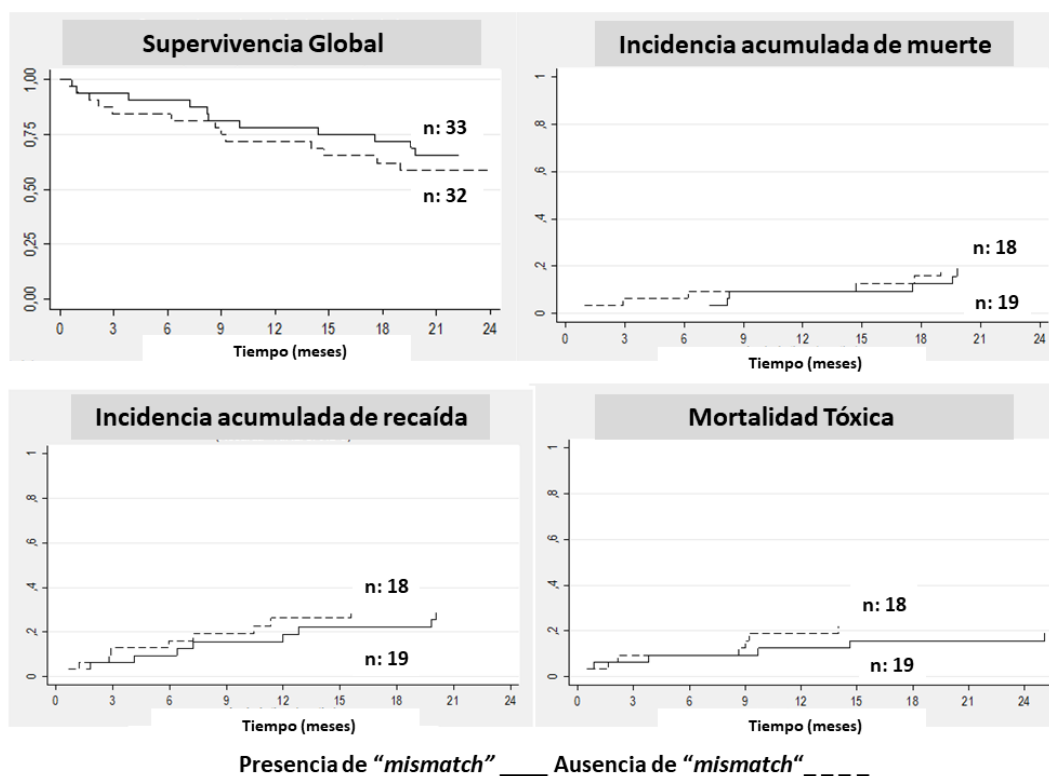


Figura 12. Gráficas de supervivencia según la presencia de mismatch de ligandos KIR.

Análisis de la supervivencia según los “mismatches” de genes KIR inhibitorios

Comparando los pacientes que presentaron “mismatch” de genes KIR inhibitorios con sus donantes con los pares que no presentaban “mismatch”, la SG a dos años fue de 78% vs 38% ($p=0,001$).), la IAM fue de 0% en comparación con los que no tenían “mismatch”, donde fue de 40% ($p=0,0001$), para la ausencia de “mismatch” la HR fue de 13 (IC95:3-56, $p=0,001$). La IAR fue de 9% en el grupo con “mismatch” en comparación con 58% en el grupo sin “mismatch” ($p=0.00008$), con una HR para la ausencia de “mismatch” de 10.3 (IC95%: 3.05-35, $p=0,0000$). La IAMT fue de 19% para los pares con “mismatch”, en comparación con los que no tenían “mismatch” donde fue del 20% ($p=0,76$), HR: 0,87 (IC95%:0,29-2,61). Podemos concluir en este apartado, que en nuestra serie, la presencia de al menos 1 “mismatch” de genes KIR inhibitorios entre donante y receptor, se asocia a un

beneficio para la supervivencia, con una menor incidencia de recaídas y muerte por la enfermedad, sin incrementar la mortalidad tóxica.

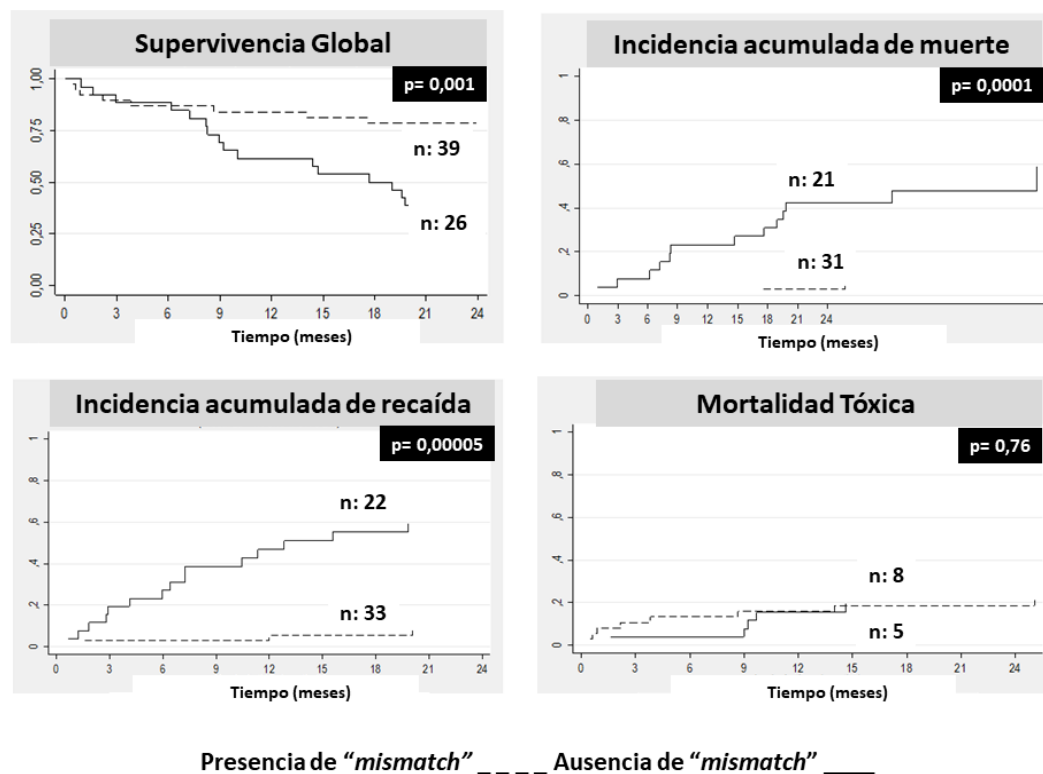


Figura 13. Gráficas de supervivencia según la presencia de mismatch de genes KIR inhibitorios.

Análisis según haplotipos activatorios e inhibitorios en el donante

Si comparamos a los pacientes que recibieron progenitores de donantes con genotipos activatorios frente a los que recibieron progenitores de donantes con genotipos inhibitorios (Bx vs AA), la HR para la IAM para los haplotipos Bx fue de 1,01 (IC95% 0,2-3,5). La HR para la IAR para los haplotipos Bx fue de 1,4 (IC95%: 0,4-4,7). La HR para la MT para los haplotipos Bx de 1,41 (IC95%: 0,31-6,41). Estos datos se mantienen sin cambios indiferentemente de si el genotipo del receptor era activatorios o inhibitorios.

Si valoramos los genotipos activatorios por el "score" de Cooley (77), los pacientes que recibieron donantes con puntuaciones más altas del "score" (3 ó 4), no presentaron un beneficio para la

supervivencia en relación a aquellos que recibieron donantes con puntuaciones más bajas (0, 1 ó 2) (para IAM HR 1,2 (IC95%: 0,7-1,9), para IAR: HR 1,4 (IC95%: 0,93-2,1), para MT: HR 1,15 (IC95%: 0,86-1,53)).

Dentro de los genotipos activatorios, hemos analizado el contenido de genes activatorios en centrómero y telómero. Para aquellos donantes con contenido centromérico activatorio (CenBB), encontramos: IAM HR: 0,8 (IC95%: 0,18-3,4), IAR: HR: 2,3 (IC95%: 0,8-6,6, $p=0,031$), MT, HR 0,45 (IC95%:0,04-4,4)

Para aquellos donantes con contenido telomérico activatorio (TelBB), encontramos: IAM HR: 0,8 (IC95% 0,19-3,4), IAR HR: 1,1 (IC95%: 0,3-3,9) MT, HR 1,17e-07 (IC95%: 4,49e-08 3,05e-07, $p=0,000$)(Figura 12). De los pacientes que recibieron donantes que presentaban TelBB, el 35% (5 pacientes) eran homocigotos para el C2, 42% (6 pacientes) eran homocigotoas para el C1, y 23% (3 pacientes) son heterocigotos

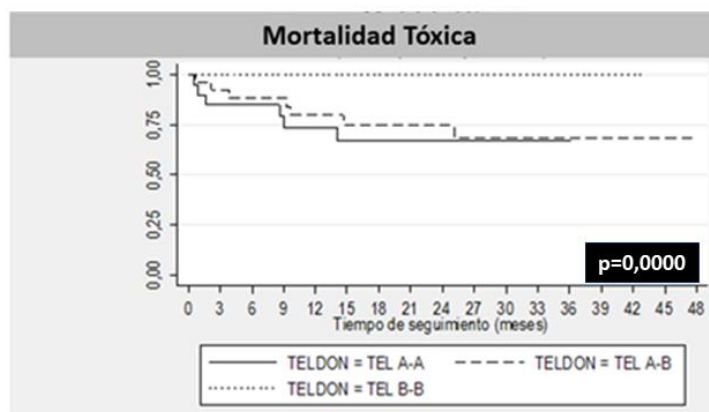


Figura 14. Mortalidad tóxica, según el contenido telomérico de genes KIR activatorios en el donante

Podemos concluir en este apartado que, en nuestra serie, no encontramos un beneficio significativo para los donantes con haplotipos activatorios (Bx), frente a aquellos con haplotipos inhibitorios (AA). Tener un mayor contenido activatorio de genes KIR valorado mediante el “score” de Cooley,

tampoco resulta un elemento protector para la supervivencia en nuestra serie. Sin embargo, al valorar el contenido de genes activatorios en el centrómero y en el telómero, encontramos que el contenido telomérico TelBB, se relaciona con una reducción significativa del riesgo de mortalidad tóxica (no relacionada con la recaída).

Análisis de la influencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1

Respecto al polimorfismo del gen del receptor KIR2DL1, es prioritario destacar que en nuestro análisis no encontramos ningún injerto con la variante “débil” del receptor, (KIR2DL1-C²⁴⁵-KIR2DL1-C²⁴⁵) en homocigosis. Los pacientes trasplantados con injertos que presentaban el polimorfismo “fuerte” del receptor en homocigosis (KIR2DL1-R²⁴⁵-KIR2DL1-R²⁴⁵), tuvieron una SG de 64% vs 65% en aquellos que recibieron el injerto heterocigoto para la variante con presencia del polimorfismo débil, la forma KIR2DL1-R²⁴⁵-KIR2DL1-C²⁴⁵ (p=0.41), una IAM de 19% y 20% a dos años (p=0.47) HR 0.59 (IC95%: 0.21-1,64), IAR fue de 22% y 25% (p=0.67), HR: 0.80 (IC95%: 0.3-2.14), y una MT de 21 y 22% (p=0.93), HR: 0.9 (IC95%: 0.2-3.04).

Por lo tanto, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, incluso para aquellos que recibieron el polimorfismo estructuralmente más fuerte en homocigosis y tenían “*mismatch*” para el ligando KIR C2 (un total de 22 pacientes, frente a 24 que presentaban KIR2DL1-R²⁴⁵-KIR2DL1-R²⁴⁵ sin “*mismatch*” para C2, y 19 con la forma KIR2DL1-R²⁴⁵-KIR2DL1-C²⁴⁵, donde la SG a dos años fue de 66%, 62% y 56% respectivamente. El análisis de IAM, IAR, y MT tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas comparando los tres grupos.

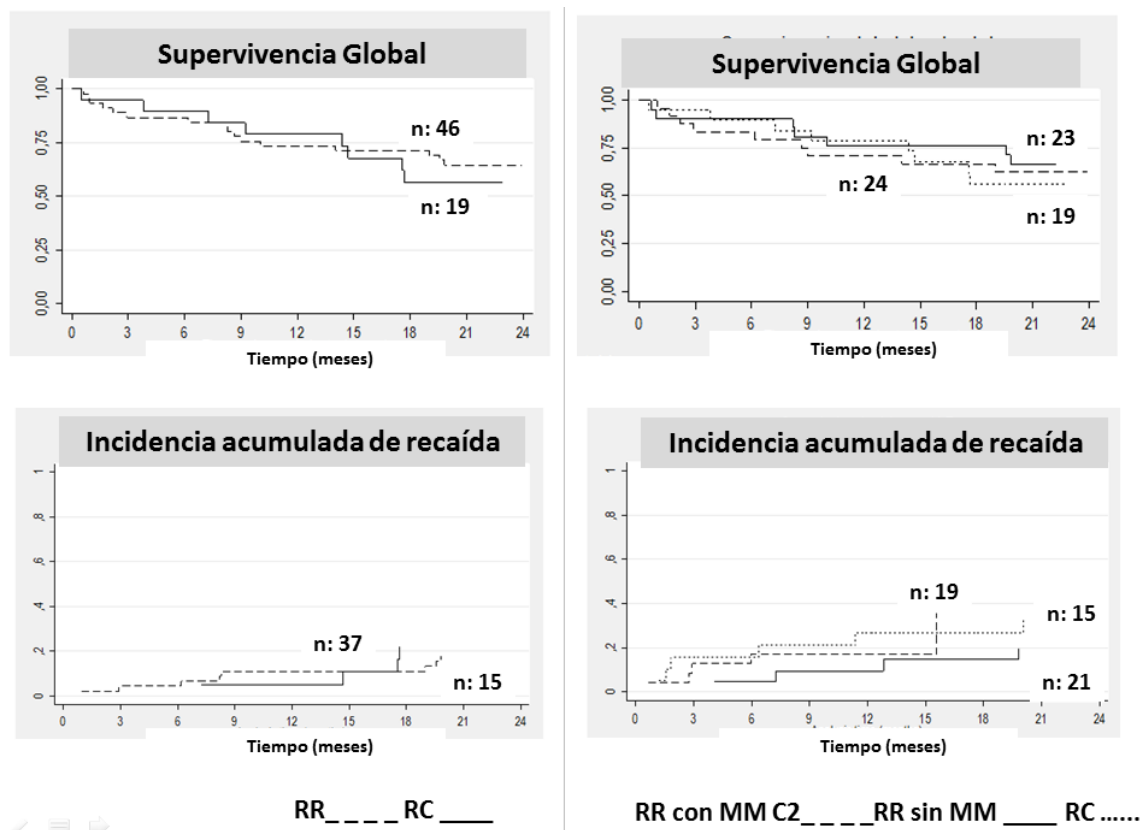


Figura 15. Gráficas de supervivencia según la presencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1 en el donante. RR: KIR2DL1-R²⁴⁵ homocigota, RC: KIR2DL1-R²⁴⁵-KIR2DL1-C²⁴⁵ heterocigota. MM: "mismatch"

Análisis de EICR en relación a la presencia de "mismatch"

Dada las diferencias estadísticamente significativas en relación a la presencia de al menos un "mismatch" entre genes KIR inhibitorios entre donante y receptor, quisimos comprobar si aquellos pares con "mismatch" presentaban también mayor incidencia de EICR.

No encontramos diferencias entre los pacientes/donantes que tenían "mismatch" para la incidencia de EICR aguda ni crónica, frente a aquel grupo que no lo tenía. Los datos que se presentan son a 24 meses. Incidencia acumulada de EICR aguda grado \geq II: 40% vs 41% ($p=0,99$), incidencia acumulada de EICR aguda grado III/IV: 18% vs 20% ($p=0,73$), incidencia acumulada de EICR crónica: 25% vs 32% ($p=0,22$, HR 0,5; IC95%: 0,2-1,3).

Tampoco encontramos mayor incidencia de EICR aguda o crónica para la presencia de “*mismatch*” de ligandos KIR, los haplotipos activatorios o inhibitorios o la presencia del polimorfismo RR ó RC en el receptor KIR2DL1.

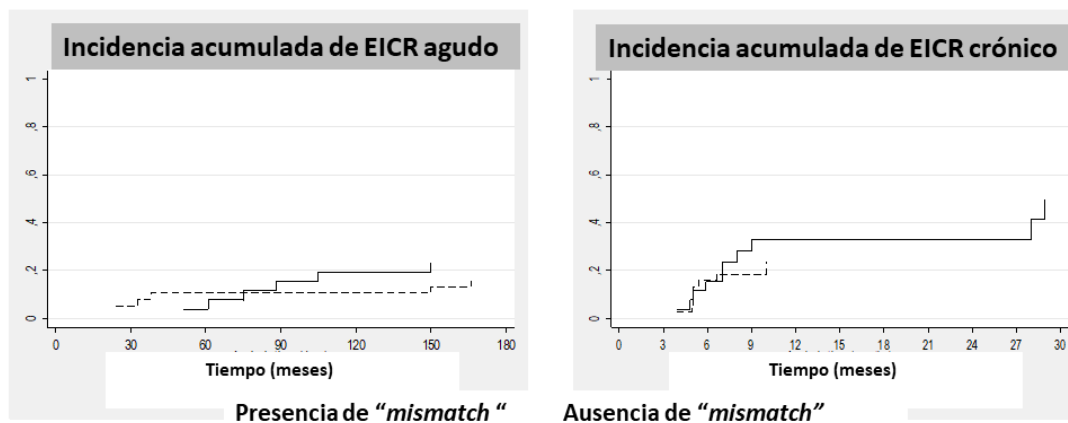


Figura 16. Gráficas de incidencia de EICR aguda o crónica en relación a la presencia de mismatch de genes iKIR.

Análisis de la citotoxicidad de las células NK (serie prospectiva)

La mediana de seguimiento de la serie prospectiva es de 24 meses (rango 13-36). Si valoramos la supervivencia en relación al grado de citotoxicidad de células NK al enfrentarlas a línea células (K562) en el ensayo de citotoxicidad medido por fluorimetría, encontramos diferencias significativas para la mortalidad, entre los pares paciente/donante, teniendo los más citotóxicos en el ensayo, un menor riesgo de muerte, y una tendencia a un menor riesgo de recaída: IAM HR: 0,41 (IC95%: 0,21-0,81; p=0,01; IAR HR: 0,59 (IC95%: 0,33-1,05; p=0,073) , MT HR: 2,43 (IC95%: 1,19-4,94; p=0,014).

Si valoramos la citotoxicidad NK mediante la degranulación de las células NK del donante, medida por la expresión de la molécula de superficie CD107a, al enfrentarlas a línea celular K562, un mayor porcentaje de degranulación se relaciona con una disminución de la mortalidad y del riesgo de recaída desde el punto de vista estadístico. IAM HR: 0,84 (IC95%: 0,75-0,95, p=0,005), IAR HR: 0,94 (IC95%: 0,89-0,99, p=0,044) MT HR: 1,02, (IC95%: 0,99-1,06, p=0,074).

La correlación entre estas dos metodologías para valorar la citotoxicidad “*in vitro*”, ha sido elevada, con un coeficiente de correlación de 0,88 para los experimentos basales, y de 0,89 para los realizados con IL-15 (Figura 17).

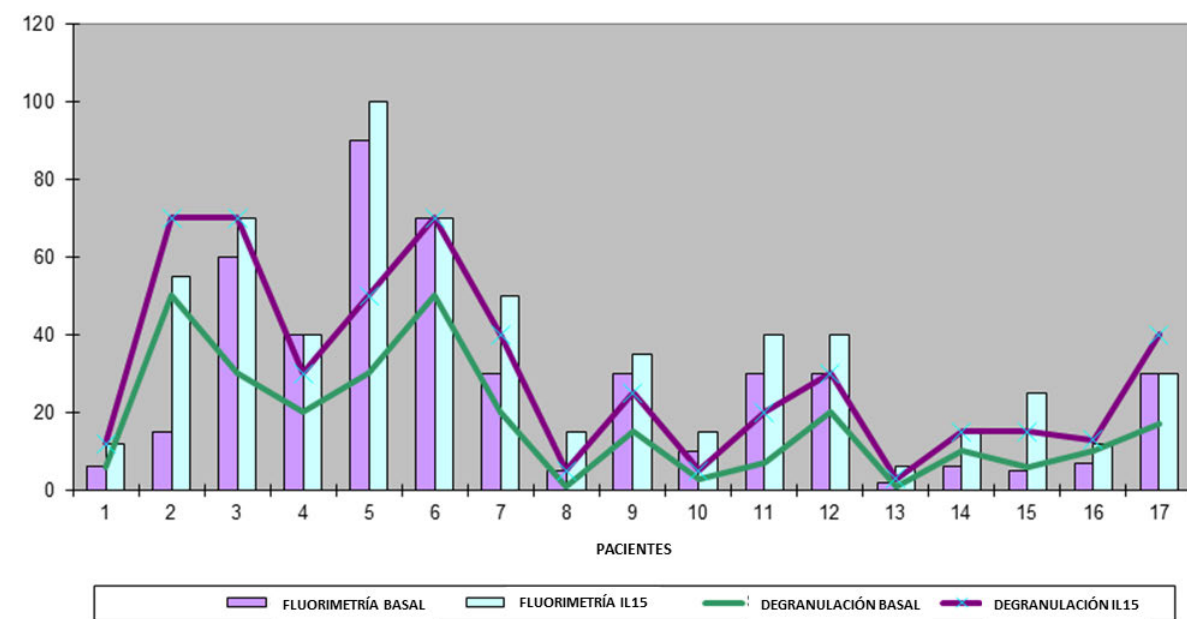


Figura 17. Comparación de estudios de citotoxicidad, realizados mediante fluorimetría (barras) y degranulación mediante CMF (líneas)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, nos cuestionamos si el efecto IcT de las células NK alogénicas del donante mediante la alorreactividad KIR favorece una reducción de la tasa de recaídas y mejorar la supervivencia de los pacientes. Como hemos visto, existen diferentes formas de valorar la alorreactividad de estas células y, en nuestra experiencia, el “*mismatch*” de genes iKIR, que implica la presencia de al menos un “*mismatch*” de genes KIR inhibitorios entre paciente y donante, es la valoración que permite distinguir a aquellos pares que tendrán mejores resultados en lo que a la recaída y la supervivencia se refiere en el trasplante haploidéntico con PT-Cy. Tal y como hemos expresado previamente, la SG, la IAM, y la IAR son significativamente mejores para los pares con al menos un “*mismatch*”, respecto a los pares sin “*mismatch*”, con un riesgo de muerte y de recaída que se incrementa en cerca de 10 veces, para aquellos pares sin “*mismatch*”. Nuestros resultados coinciden con los publicados por el grupo de Baltimore, en el que Symons y col (71) encontraban también que esta variable, se asocia con una reducción de la tasa de recaídas y una mejoría de la supervivencia. Asimismo, nuestro grupo de investigación publicó recientemente estos resultados con un seguimiento más corto, donde también se observaba esta tendencia (82). La importancia de estos resultados radica en la implicación que pueden tener para la selección de un donante, que como ya hemos visto, es fundamental en el caso de donantes haploidénticos, donde el número de posibles donantes, considerando hermanos, padres e hijos puede ser elevado. Disponer de una variable que permita seleccionar a aquel donante más efectivo contra la enfermedad del paciente, es una herramienta que sin duda beneficiará a nuestros pacientes. Hasta el momento actual, la valoración del “*mismatch*” de genes iKIR se ha realizado en estudios de forma retrospectiva, por tanto, es a partir del presente estudio, cuando se puede incorporar esta variable a la práctica clínica habitual. Llamativamente, y a diferencia de lo que varios grupos han demostrado previamente, la valoración de alorreactividad KIR mediante el mismatch de ligandos deducido desde el estudio HLA, no se asocia en nuestra serie a un beneficio para la supervivencia, ni de la SG, ni la IAM, ni la IAR. Cabe aclarar que, de momento, ningún grupo ha demostrado que esta variable tenga alguna influencia en el

trasplante haploidéntico PT-Cy (71), sino que se han trasladado los buenos resultados obtenidos en el contexto del trasplante haploidéntico con eliminación de linfocitos T (60). Este dato, también resulta de gran importancia para nuestra práctica clínica habitual, ya que nos permite dejar de considerar una variable a la hora de seleccionar un donante, que previamente sí podríamos haber tenido en cuenta. Respecto del contenido activatorio e inhibitorio de los haplotipos del donante, la presencia de un haplotipo activatorio en el donante, no se asocia en nuestra serie con un beneficio para la supervivencia, ni con una reducción de la tasa de recaídas. Es importante destacar que este dato, que demostró en una larga serie de pacientes el estudio de Cooley y col (76), se hizo fue en el contexto de alo-TPH de donante no emparentado y en un grupo homogéneo de pacientes con leucemia aguda mieloide (76,77,95). En otras patologías como el linfoma de Hodgkin existen también datos recientes sobre el beneficio para la supervivencia al utilizar donantes con haplotipos activatorios (95). Asimismo, la elección de este tipo de donantes también se ha consolidado como un beneficio en el trasplante idéntico (96) y en el trasplante haploidéntico con eliminación de linfocitos T del injerto (97). Sin embargo, no se han reproducido los resultados en el trasplante no emparentado con “*mismatch*” (95). En el caso del haplo-TPH con Pt-Cy, según algunos autores, podría observarse un beneficio para la supervivencia sólo si se selecciona un donante Bx en caso de pacientes con haplotipos inhibitorios AA (71).

Por otra parte, el análisis del contenido de genes activatorios e inhibitorios centroméricos y teloméricos, ha aportado resultados de gran interés. Si bien el contenido centromérico activatorio (CenBB), dato que, como ya se ha mencionado, sí resulta beneficioso en el contexto del trasplante no relacionado (77), no se asocia, en nuestra serie, a un beneficio para la supervivencia o a una menor tasa de recaídas, el contenido telomérico activatorio, sí se encuentra relacionado con una reducción de la mortalidad, pero de aquellas causas de muerte no relacionadas con la recaída (la MT).

Llamativamente, aquellos pacientes trasplantados con donantes con contenido telomérico TelBB (ver Figura 6), presentaron una reducción de 10 veces en el riesgo de muerte de causa tóxica. Este factor

protector de los genes teloméricos, ha sido previamente evaluado por otros autores. Venstrom y col (98) realizaron un estudio sobre 1277 pacientes con LMA sometidos a trasplante alogénico idéntico no relacionado, y encontraron que la presencia de los genes KIR activatorios y, en especial, el KIR3DS1 (ambos teloméricos) se asocia con una menor tasa mortalidad tóxica (no relacionada con la recaída). Este mismo autor ha presentado resultados que sugieren que la presencia de genes teloméricos activatorios en el donante sería un factor protector para el desarrollo de EICR, y describe una disminución de la tasa de EICR para aquellos pacientes que reciben injertos de donantes homocigotos para KIR3DS1 (99). Asimismo, en un estudio reciente realizado por el grupo de Perugia, se observa que la presencia de los receptores activatorios KIR2DS1 y KIR3DS1 se relaciona con una disminución de la tasa de infecciones, cuando existe “*mismatch*” de ligandos C2 entre donante y receptor y, por tanto, activación de estos receptores. El mecanismo subyacente a estas observaciones podría relacionarse con la liberación de citocinas pro-inflamatorias como el INF, entre otras (100). Por otra parte, estos genes KIR activatorios, especialmente KIR3DS1, han sido asociados con un efecto protector para el desarrollo de infecciones virales (101), e incluso para la infección por el VIH (102).

En lo que a nuestra experiencia respecta y en lo que a nuestra práctica clínica concierne, nuestros resultados, sin duda, nos alientan para continuar investigando en este sentido. En nuestra serie, de los pacientes que fallecieron por causas no relacionadas con la recaída de la enfermedad, un total de 14 enfermos, ninguno tenía contenido telomérico activatorio tipo telBB (y por tanto homocigocis para el KIR2DS1 y KIR3DS1). El resultado no es estadísticamente significativo si se valoran los donantes TelAB. Cabe aclarar que, en nuestro caso, el 79% de los pacientes tenía “*mismatch*” de ligandos con el receptor, el 35% de estos pacientes eran homocigotas para el ligando C2, y por lo tanto estarían teóricamente inactivando al receptor KIR, el 42% eran homocigotas para el ligando C1, y 23% heterocigotas C1-C2. Se precisa una serie más extensa de pacientes para analizar cada grupo por separado y comprobar si se mantienen los resultados en cada grupo, a pesar del ligando que presente

el receptor. De todas formas, ésta es una variable que resulta muy atractiva para ser incorporada en la valoración integral del donante, considerando que cerca de la mitad de los donantes presentarán estos genes teloméricos, y hasta un tercio combinaría esta situación con la ausencia del ligando inhibitorio. A la hora de la elección del donante, se deberá de valorar también, con futuros estudios prospectivos, el peso relativo que tiene esta variable y en qué orden se suman a las variables utilizadas actualmente para la elección del “mejor donante”.

La presencia de diferentes polimorfismos en el injerto del receptor KIR2DL1, no se ha asociado en nuestra serie a un beneficio para la supervivencia o para la tasa de recaídas. El interés en el análisis de esta variable se basó en varios estudios donde se sugiere que los alelos KIR2DL1-R245, funcionalmente más fuertes, son aparentemente más potentes que los alelos KIR2DL1-C245, más débiles en el adoctrinamiento de células NK, dando como resultado un mejor control del cáncer y la supervivencia del paciente después de TPH (80,103). Bari y col (81), realizaron un estudio en un grupo de 313 pacientes con neoplasias pediátricas, evaluando si la presencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1-R²⁴⁵ por el cual se expresa una arginina en la posición 245 del dominio transmembrana del receptor, es más fuerte a la hora de emitir su señal en respuesta a la ausencia de ligando, respecto a la variante con cisteína (KIR2DL1-C²⁴⁵) en dicha posición y la cual sería más débil. Según sus resultados, donde se evalúan pacientes con diferentes patologías hematológicas y sometidos a diferentes tipos de trasplante, incluyendo hermano idéntico, no emparentado y haploidéntico, la unión del ligando al KIR2DL1-R²⁴⁵ se relaciona con una mayor supervivencia y una menor incidencia de recaídas. Este efecto se mantiene tanto en LMA como en LLA, y por otra parte, es especialmente notable para aquellos pares paciente donante, donde existe “*mismatch*” de ligandos “C”. Esta observación no ha sido reproducida hasta la fecha por otros grupos de investigación en pacientes adultos. En nuestra serie, tampoco hemos encontrado beneficios para la supervivencia o la tasa de recaídas, para aquellos pacientes que recibieron injertos con el receptor que presenta el polimorfismo más “fuerte”, ni siquiera en aquellos pares donde existe “*mismatch*” de

ligandos “C”. Este resultado concuerda, de alguna forma, con no haber encontrado tampoco en nuestra serie beneficios respecto a la presencia de “*mismatch*” de ligandos KIR. Sin embargo, es importante destacar que, en nuestra serie, no hemos encontrado ningún donante homocigoto para KIR2DL1-C²⁴⁵, lo que tiene sentido si tenemos en cuenta su baja incidencia (5-10%) y número de casos incluidos en el estudio. Por lo tanto, si bien no encontramos beneficios claros, no podemos ser categóricos en afirmar que la presencia de uno u otro polimorfismo influya en la evolución del trasplante. Es necesario analizar un mayor número de casos para obtener conclusiones definitivas.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos en el estudio prospectivo, que incluye 17 pacientes, hay que resaltar, ante todo, que esta serie tiene una mediana de seguimiento mucho más corta, y un número de casos bastante más reducido. Sin embargo, los datos obtenidos de este análisis, son de gran interés, sobre todo de cara a estudios futuros.

Como previamente se ha descrito, hemos realizado dos métodos diferentes para valorar citotoxicidad de células NK frente a células diana, ya sean de la línea celular K562 o los blastos de los pacientes. Ante todo, es importante destacar que en nuestro estudio encontramos una correlación elevada entre los dos diferentes métodos utilizados para valorar citotoxicidad, con un coeficiente de correlación de 0.88 para los experimentos basales y de 0.89 cuando la toxicidad se midió tras la estimulación de las células NK con IL15. Este resultado no ha sido referido previamente en la literatura, y resulta de gran utilidad ya que abre a la posibilidad de utilizar una metodología u otra según resulte más accesible en cada caso. El estudio citométrico es probablemente más práctico de realizar y, además, permite valorar la degranulación específicamente sobre la población de células NK. En el ensayo de citotoxicidad por fluorimetría, por su parte, la intensidad de liberación del fluorocromo se mide en la celularidad total y se estima de forma matemática, a posteriori, la derivada de las células NK. Por otra parte, cabe remarcar, y resulta una aclaración fundamental a la hora de interpretar los resultados, que todos los estudios se realizaron con la línea celular, K562, no habiéndose conseguido una

adecuada conservación de los blastos leucémicos de los pacientes para reproducir el estudio. Los ensayos realizados, sin embargo, han sido de utilidad pues han permitido identificar la causa por la cual los blastos leucémicos no sobrevivían a los métodos de congelación y descongelación utilizados, y nos han proporcionado la experiencia necesaria para el abordaje de futuros estudios. Por lo tanto, si bien nuestros resultados muestran una tendencia protectora en los pacientes que recibieron injertos más “citotóxicos” por ambos métodos, la utilización de la línea celular, nos limita para valorar la utilidad de estas técnicas a la hora de informar adecuadamente una relación entre el grado de citotoxicidad y la supervivencia o mortalidad de la serie, ya que, como previamente se comentó, las células tumorales que afectan a cada uno de los diferentes pacientes no tiene por qué coincidir en la expresión de ligandos de superficie con los de la línea celular, en este caso la línea K562 que conocemos que no expresa ninguno de los ligandos KIR inhibitorios. En cualquier caso, el haber puesto a punto las técnicas descritas, ha dejado abierto el camino a futuras investigaciones en este campo, que de hecho ya están en marcha en nuestro centro.

La principal aportación de nuestro estudio es el haber identificado dos factores, por un lado el “*mismatch*” de genes KIR inhibitorios entre paciente y donante, que se relaciona con una disminución de la tasa de recaídas y una mejoría para la supervivencia, y por otro el contenido telomérico activatorio en el genotipo KIR del donante, que disminuye el riesgo de muerte no relacionada con la recaída, y que ambos pueden ser incorporados para la selección del donante en el contexto del trasplante haploidéntico con Pt-Cy. Asimismo, hemos comenzado a cuestionarnos la significancia real de valoraciones que se consultaban hasta ahora para la selección del donante, como el “*mismatch*” de ligandos KIR entre injerto y receptor, el contenido activatorio en el centrómero del genotipo del donante, o el “*score*” de Cooley, que no han resultado en nuestra serie beneficiosas para disminuir la tasa de recaídas o mejorar la supervivencia.

No podemos acabar sin considerar las limitaciones que hemos identificado en el presente estudio. Sin duda, la primera limitación es el número de casos relativamente reducido el cual, si bien limita la potencia del análisis, no ha impedido realizar algunas observaciones de interés que se deberán consolidar con el seguimiento de los casos a largo plazo y con la inclusión de nuevos pacientes en el estudio. En relación con este hecho, la limitación en el número de casos, provoca que sea necesario realizar el análisis con todos los pacientes de forma conjunta, sin poder agrupar por tipo de neoplasia, o por intensidad de acondicionamiento, aspecto que también se pretende abordar más adelante con la inclusión de nuevos pacientes. Por último, el no haber podido realizar el estudio “*in vitro*” de citotoxicidad con células diana (blastos) del paciente, sino sólo con la línea celular, no ha permitido hacer una apreciación suficientemente realista de la contribución del grado de actividad citotóxica de las células NK para combatir la enfermedad. Sin embargo, una vez superados los problemas metodológicos y optimizada la prueba, se han podido incluir nuevos pacientes en los que sí se ha logrado realizar el estudio con sus propias células neoplásicas, lo que permitirá conocer su verdadera relevancia clínica cuando se disponga de un adecuado tiempo de seguimiento de estos casos.

CONCLUSIONES

El estudio descrito permite concluir que en los pacientes con neoplasias hematológicas sometidos a trasplante haploidéntico con Pt-Cy:

6. La presencia de al menos un “*mismatch*” de genes KIR inhibitorios entre donante y receptor se asociado con una disminución de la tasa de recaídas de la enfermedad y una mejoría de la supervivencia global.
7. La presencia de “*mismatch*” de ligandos KIR entre el donante y el receptor no se relaciona con una disminución de la tasa de recaídas de la enfermedad o una mejoría de la supervivencia.
8. El contenido activatorio telomérico en el genotipo del donante tipo TelBB, se relaciona con una disminución de la mortalidad no relacionada con la recaída.
9. El contenido activatorio centromérico del genotipo del donante utilizado o un mayor número en el “*score*” de Cooley, no se relaciona con una disminución de la tasa de recaída de la enfermedad o con una mejoría de la supervivencia.
10. La presencia del polimorfismo del receptor KIR2DL1 no se relaciona con una disminución de la tasa de recaída de la enfermedad o con una mejoría de la supervivencia.
11. Los resultados de los estudios de citotoxicidad NK “*in vitro*” realizados mediante técnicas de fluorimetría o valoración por citometría de flujo de la degranulación de las células mediante la expresión del CD107a, muestran una elevada correlación, lo que indica que ambos resultan

útiles para la valoración de citotoxicidad “*in vitro*” al enfrentar las células NK del donante a la línea celular K562.

12. Las células NK del donante más citotóxicas contra línea celular, se relacionan con una reducción de la mortalidad y de la tasa de recaída en el paciente, pero deben ser enfrentadas a blastos del enfermo para confirmar su efectividad.

BIBLIOGRAFÍAS

1. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 29 de enero de 2009;457(7229):557-61.
2. Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of Human NK Cell Development and Terminal Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 30 de diciembre de 2013 [citado 18 de noviembre de 2016];4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874559/>
3. Horowitz A, Stegmann KA, Riley EM. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol*. 2011;2:88.
4. Haller O, Wigzell H. Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J Immunol Baltim Md* 1950. abril de 1977;118(4):1503-6.
5. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Jawad AF. Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol*. noviembre de 1999;6(6):906-11.
6. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 18 de marzo de 2010;115(11):2167-76.
7. Aricò M, Janka G, Fischer A, Henter JI, Blanche S, Elinder G, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Leukemia*. febrero de 1996;10(2):197-203.
8. Björkström NK, Ljunggren H-G, Sandberg JK. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol*. noviembre de 2010;31(11):401-6.
9. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 11 de noviembre de 2010;116(19):3865-74.
10. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de enero de 2011;108(2):728-32.
11. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 20 de febrero de 1986;319(6055):675-8.
12. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 1 de noviembre de 2001;22(11):633-40.
13. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 27 de abril de 2006;354(17):1813-26.
14. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 17 de mayo de 2001;411(6835):385-9.

15. de la Morena MT, Gatti RA. A history of bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am.* febrero de 2011;25(1):1-15.
16. Storb R. Edward Donnall Thomas (1920-2012). *Nature.* 15 de noviembre de 2012;491(7424):334.
17. Park B, Yoo KH, Kim C. Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. *Blood Res.* diciembre de 2015;50(4):194-203.
18. Ballen KK, King RJ, Chitphakdithai P, Bolan CD, Agura E, Hartzman RJ, et al. The national marrow donor program 20 years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* septiembre de 2008;14(9 Suppl):2-7.
19. Oran B, Shpall E. Umbilical cord blood transplantation: a maturing technology. *ASH Educ Program Book.* 12 de agosto de 2012;2012(1):215-22.
20. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de febrero de 2011;29(5):475-86.
21. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:47-55.
22. Appelbaum FR, Pearce SF. Hematopoietic cell transplantation in first complete remission versus early relapse. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(2):333-9.
23. Gökbuget N. How I treat older patients with ALL. *Blood.* 22 de agosto de 2013;122(8):1366-75.
24. Juliusson G, Karlsson K, Lazarevic VL, Wahlin A, Brune M, Antunovic P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation rates and long-term survival in acute myeloid and lymphoblastic leukemia: real-world population-based data from the Swedish Acute Leukemia Registry 1997-2006. *Cancer.* 15 de septiembre de 2011;117(18):4238-46.
25. Gratwohl A, Brand R, Frasson F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* noviembre de 2005;36(9):757-69.
26. Cairo MS, Jordan CT, Maley CC, Chao C, Melnick A, Armstrong SA, et al. NCI first International Workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report from the committee on the biological considerations of hematological relapse following allogeneic stem cell transplantation unrelated to graft-versus-tumor effects: state of the science. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* junio de 2010;16(6):709-28.
27. Doderio A, Patriarca F, Milone G, Sarina B, Miceli R, Iori A, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Relapsed/Refractory B-Cell Lymphomas: Results of a Multicenter Phase II Prospective Trial Including Rituximab in the Reduced Intensity Conditioning Regimen. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 5 de abril de 2017;

28. Van Den Neste E, Schmitz N, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, et al. Outcomes of diffuse large B-cell lymphoma patients relapsing after autologous stem cell transplantation: an analysis of patients included in the CORAL study. *Bone Marrow Transplant.* febrero de 2017;52(2):216-21.
29. Gayoso J, Balsalobre P, Pascual MJ, Castilla-Llorente C, López-Corral L, Kwon M, et al. Busulfan-based reduced intensity conditioning regimens for haploidentical transplantation in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma: Spanish multicenter experience. *Bone Marrow Transplant.* octubre de 2016;51(10):1307-12.
30. Onida F, de Wreede LC, van Biezen A, Eikema D-J, Byrne JL, Iori AP, et al. Allogeneic stem cell transplantation in patients with atypical chronic myeloid leukaemia: a retrospective study from the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol.* 28 de marzo de 2017;
31. Scott BL, Pasquini MC, Logan BR, Wu J, Devine SM, Porter DL, et al. Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de abril de 2017;35(11):1154-61.
32. Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* septiembre de 2008;142(6):877-88.
33. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2 de mayo de 2009;373(9674):1550-61.
34. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med.* 26 de septiembre de 1985;313(13):765-71.
35. Powles RL, Morgenstern GR, Kay HE, McElwain TJ, Clink HM, Dady PJ, et al. Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. *Lancet Lond Engl.* 19 de marzo de 1983;1(8325):612-5.
36. Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, Gale RP, Ash RC, Bach FH, et al. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* mayo de 1997;15(5):1767-77.
37. Ash RC, Horowitz MM, Gale RP, van Bekkum DW, Casper JT, Gordon-Smith EC, et al. Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant.* junio de 1991;7(6):443-52.
38. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 de mayo de 2005;23(15):3447-54.
39. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 15 de marzo de 2002;295(5562):2097-100.

40. Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature*. 13 de junio de 1959;183(4676):1682-3.
41. Berenbaum MC, Brown IN. PROLONGATION OF HOMOGRAFT SURVIVAL IN MICE WITH SINGLE DOSES OF CYCLOPHOSPHAMIDE. *Nature*. 5 de octubre de 1963;200:84.
42. Berenbaum MC, Brown IN. DOSE-RESPONSE RELATIONSHIPS FOR AGENTS INHIBITING THE IMMUNE RESPONSE. *Immunology*. enero de 1964;7:65-71.
43. Aisenberg AC, Wilkes B. Immunological tolerance induced by cyclophosphamide assayed by plaque spleen cell method. *Nature*. 4 de febrero de 1967;213(5075):498-9.
44. Mayumi H, Umesue M, Nomoto K. Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview. *Immunobiology*. julio de 1996;195(2):129-39.
45. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 1 de junio de 2001;97(11):3390-400.
46. O'Donnell PV, Luznik L, Jones RJ, Vogelsang GB, Leffell MS, Phelps M, et al. Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2002;8(7):377-86.
47. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. junio de 2008;14(6):641-50.
48. Luznik L, Bolaños-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood*. 22 de abril de 2010;115(16):3224-30.
49. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood*. 1 de diciembre de 2011;118(23):6006-17.
50. Locatelli F, Vinti L, Palumbo G, Rossi F, Bertaina A, Mastronuzzi A, et al. Strategies to optimize the outcome of children given T-cell depleted HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. septiembre de 2011;24(3):339-49.
51. Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. enero de 2008;41(2):207-14.
52. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK, et al. T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de abril de 2013;31(10):1310-6.

53. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 25 de noviembre de 2000;356(9244):1795-9.
54. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*. 21 de abril de 1995;268(5209):405-8.
55. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, et al. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity*. mayo de 1995;2(5):439-49.
56. Valiante NM, Parham P. Natural killer cells, HLA class I molecules, and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. noviembre de 1997;3(5):229-35.
57. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*. diciembre de 2002;190:40-52.
58. Marsh SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol*. junio de 2003;64(6):648-54.
59. Leung W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *Br J Haematol*. octubre de 2011;155(1):14-29.
60. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 1 de julio de 2007;110(1):433-40.
61. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev*. agosto de 2008;224:58-69.
62. Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Bertaina A, Falco M, Moretta A, et al. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol*. 2013;4:15.
63. Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Trenchel R, et al. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*. 15 de marzo de 2005;105(6):2594-600.
64. Kröger N, Shaw B, Iacobelli S, Zabelina T, Peggs K, Shimoni A, et al. Comparison between antithymocyte globulin and alemtuzumab and the possible impact of KIR-ligand mismatch after dose-reduced conditioning and unrelated stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. junio de 2005;129(5):631-43.

65. Elmaagacli AH, Ottinger H, Koldehoff M, Peceny R, Steckel NK, Trensche R, et al. Reduced risk for molecular disease in patients with chronic myeloid leukemia after transplantation from a KIR-mismatched donor. *Transplantation*. 27 de junio de 2005;79(12):1741-7.
66. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 1 de agosto de 2003;102(3):814-9.
67. Bishara A, De Santis D, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, et al. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens*. marzo de 2004;63(3):204-11.
68. Huang X-J, Zhao X-Y, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P. Deleterious effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion. *Leukemia*. abril de 2007;21(4):848-51.
69. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 15 de noviembre de 2002;100(10):3825-7.
70. Vago L, Forno B, Sormani MP, Crocchiolo R, Zino E, Di Terlizzi S, et al. Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 15 de octubre de 2008;112(8):3488-99.
71. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, Zahurak M, Jones RJ, Fuchs EJ. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. abril de 2010;16(4):533-42.
72. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 4 de agosto de 2005;436(7051):709-13.
73. Gagne K, Brizard G, Gueglio B, Milpied N, Herry P, Bonneville F, et al. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol*. abril de 2002;63(4):271-80.
74. Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de enero de 2004;172(1):644-50.
75. Miller JS, Cooley S, Parham P, Farag SS, Verneris MR, McQueen KL, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*. 1 de junio de 2007;109(11):5058-61.
76. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, et al. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 15 de enero de 2009;113(3):726-32.

77. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 7 de octubre de 2010;116(14):2411-9.
78. Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon J-D, et al. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. agosto de 2006;12(8):828-36.
79. Hou LH, Steiner NK, Chen M, Belle I, Ng J, Hurley CK. KIR2DL1 allelic diversity: four new alleles characterized in a bone marrow transplant population and three families. *Tissue Antigens*. marzo de 2007;69(3):250-4.
80. Bari R, Bell T, Leung W-H, Vong QP, Chan WK, Das Gupta N, et al. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine 245. *Blood*. 10 de diciembre de 2009;114(25):5182-90.
81. Bari R, Rujkijyanont P, Sullivan E, Kang G, Turner V, Gan K, et al. Effect of donor KIR2DL1 allelic polymorphism on the outcome of pediatric allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de octubre de 2013;31(30):3782-90.
82. Bastos-Oreiro M, Anguita J, Martínez-Laperche C, Fernández L, Buces E, Navarro A, et al. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *Eur J Haematol*. mayo de 2016;96(5):483-91.
83. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 26 de marzo de 2009;113(13):3119-29.
84. Rutella S, Rumi C, Laurenti L, Pierelli L, Sora' F, Sica S, et al. Immune reconstitution after transplantation of autologous peripheral CD34+ cells: analysis of predictive factors and comparison with unselected progenitor transplants. *Br J Haematol*. enero de 2000;108(1):105-15.
85. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 15 de abril de 2005;105(8):3051-7.
86. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de febrero de 2010;28(6):955-9.
87. Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant*. marzo de 2013;48(3):433-8.
88. Yoon SR, Lee YS, Yang SH, Ahn KH, Lee J-H, Lee J-H, et al. Generation of donor natural killer cells from CD34(+) progenitor cells and subsequent infusion after HLA-mismatched allogeneic

hematopoietic cell transplantation: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant.* junio de 2010;45(6):1038-46.

89. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 22 de septiembre de 2011;118(12):3273-9.
90. Locatelli F, Merli P, Rutella S. At the Bedside: Innate immunity as an immunotherapy tool for hematological malignancies. *J Leukoc Biol.* diciembre de 2013;94(6):1141-57.
91. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1 de mayo de 1991;173(5):1099-109.
92. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med.* 3 de octubre de 2005;202(7):1001-12.
93. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* diciembre de 2005;11(12):945-56.
94. Vigorito AC, Campregher PV, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem H-P, et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood.* 16 de julio de 2009;114(3):702-8.
95. Bachanova V, Weisdorf DJ, Wang T, Marsh SGE, Trachtenberg E, Haagenson MD, et al. Donor KIR B Genotype Improves Progression-Free Survival of Non-Hodgkin Lymphoma Patients Receiving Unrelated Donor Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* septiembre de 2016;22(9):1602-7.
96. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood.* 15 de junio de 2005;105(12):4878-84.
97. Moretta A, Pende D, Locatelli F, Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. *Clin Exp Immunol.* septiembre de 2009;157(3):325-31.
98. Venstrom JM, Pittari G, Gooley TA, Chewning JH, Spellman S, Haagenson M, et al. HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N Engl J Med.* 30 de agosto de 2012;367(9):805-16.
99. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, et al. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 15 de abril de 2010;115(15):3162-5.

100. Mancusi A, Ruggeri L, Urbani E, Pierini A, Massei MS, Carotti A, et al. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood*. 14 de mayo de 2015;125(20):3173-82.
101. Della Chiesa M, Sivori S, Carlomagno S, Moretta L, Moretta A. Activating KIRs and NKG2C in Viral Infections: Toward NK Cell Memory? *Front Immunol*. 2015;6:573.
102. Zipperlen K, Gallant M, Stapleton S, Heath J, Barrett L, Grant M. Protective genotypes in HIV infection reflect superior function of KIR3DS1+ over KIR3DL1+ CD8+ T cells. *Immunol Cell Biol*. enero de 2015;93(1):67-76.
103. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little A-M, Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 15 de septiembre de 2008;112(6):2369-80.

